



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
Ano 2010/2011

**Liliana Gonçalves  
Fidalgo**

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO EM DEMOLHA DE  
BACALHAU E ENZIMAS DE CAVALA**



**Liliana Gonçalves  
Fidalgo**

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO EM DEMOLHA DE  
BACALHAU E ENZIMAS DE CAVALA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica - Ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e namorado como forma da  
minha gratidão...

## **O júri**

Presidente

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva  
Professor associado com agregação do Departamento de Química da  
Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva  
Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo  
Professora associada com agregação do Departamento de Química da  
Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Carla Alexandra Pina da Cruz Nunes  
Professora auxiliar convidada da Secção Autónoma de Ciências da Saúde da  
Universidade de Aveiro

## Agradecimentos

A realização desta dissertação marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

Ao Professor Doutor Jorge Saraiva pela disponibilidade, colaboração, conhecimentos transmitidos e capacidade de estímulo ao longo da realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ivonne Delgadillo pela orientação científica, apoio e disponibilidade prestada em todas as minhas solicitações.

À aluna de doutoramento Bárbara Teixeira, pela grande ajuda na realização deste trabalho.

À Doutora Amparo Faustino pela disponibilidade na utilização do espectrofotómetro de fluorescência.

À aluna Rita Inácio e Maria João Mota pela grande ajuda que disponibilizaram na realização de alguns ensaios laboratoriais.

Aos meus colegas de laboratório, pelo companheirismo, ajuda e amizade.

Aos meus amigos, que sempre me acompanharam neste percurso académico.

Aos meus pais e irmãos porque sem eles nada disto seria possível.

Ao meu namorado, Nuno Freire, pelo apoio, compreensão e, principalmente, por toda a força, que muitas vezes foi necessária.

E finalmente, ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro pelas condições para a realização deste trabalho.

*“Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida.”*

Confúcio

## Palavras-chave

Alta pressão hidrostática, enzimas, catepsina B, fosfatase ácida, catepsina D, lipase, bacalhau, demolha, cavala.

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo (a) acelerar o processo de demolha de bacalhau através da utilização da alta pressão; (b) estudar a variação da atividade enzimática, da proteína solúvel e pH durante a demolha de bacalhau à pressão atmosférica (0,1 MPa) e a duas temperaturas (4 e 20°C); (c) estudar o efeito da alta pressão na atividade enzimática da cavala.

Inicialmente verificou-se que o nível de vácuo, usado no embalamento não tem efeito no processo de demolha à pressão atmosférica (0,1 MPa) e sob pressão (200 MPa). Nos ensaios realizados para otimizar o processo de demolha, verificou-se que: (a) a aplicação de ciclos sucessivos de 5 minutos de demolha sob alta pressão a 200 MPa durante 5 minutos, com troca de água de demolha e com dois níveis de vácuo (55 e 85%), não melhora o processo de demolha, do ponto de vista da quantidade de sal e água difundidos; (b) a realização de uma demolha durante 30 minutos a 0,1 MPa, seguida de demolha durante 5 segundos/1 minuto a 200 MPa, após troca de água de demolha, não melhora o processo de demolha. Contudo, se após a primeira demolha, se se deixar a amostra a repousar durante 60 minutos, após a retirada da água de demolha, consegue-se obter uma redução de sal de 65% (comparativamente aos 35% obtidos na demolha apenas a 200 MPa), sendo esta uma via de otimização da demolha, que deve ser objeto de estudos mais aprofundados.

Durante a demolha à pressão atmosférica, observou-se: a proteína solúvel diminui ao longo do tempo, concluindo-se que a perda se deve à solubilização das proteínas na água de demolha; um aumento do pH, mais acentuado a 20°C do que a 4°C; que a atividade das enzimas fosfatase ácida, catepsina B e catepsina D diminui ao longo do processo de demolha (sendo esta diminuição mais acentuada na demolha a 20°C), enquanto que a atividade da lipase aumenta ao longo do processo, e de modo mais acentuado para a demolha a 20°C.

Finalmente, estudou-se o efeito de tratamentos por alta pressão na atividade enzimática da cavala, tendo como objetivo inativar enzimas que participam na degradação do músculo de peixe e reduzir a atividade destas mesmas enzimas ao longo do tempo de conservação em congelação. Conclui-se que tanto a pressão, o tempo de pressurização e o tempo de conservação têm um efeito na atividade enzimática do músculo de cavala. O efeito da alta pressão foi menos acentuado no caso da atividade da fosfatase ácida. Na catepsina B observou-se que existe tendência para diminuição da atividade para pressões superiores (450 MPa) para as amostras analisadas logo após a congelação (mês 0), observando-se um aumento com o aumento do tempo de conservação das amostras congeladas. Para a catepsina D observou-se que a 300 MPa a atividade da enzima aumenta, podendo este resultado ser devido à libertação da enzima dos lisossomos devido destruição destes pela pressão. Para a lipase observou-se um efeito mais pronunciado da pressão, ocorrendo uma diminuição maior da atividade a 450 MPa no mês 0, aumentando a atividade com tempo de conservação

## Keywords

High hydrostatic pressure, enzymes, acid phosphatase, cathepsin B, cathepsin D, lipase, cod, *Gadus morhua*, desalting, mackerel.

## Abstract

The aim of this work was: (a) the use of high hydrostatic pressure to accelerate the desalting process of cod fish; (b) study the variation in enzyme activity, soluble protein and pH during the desalting process of cod fish at atmospheric pressure (0.1 MPa) and two temperatures (4 and 20°C); (c) study the effect of high pressure on enzymatic activity of mackerel.

Initially it was verified that the vacuum level, used for packaging had no effect on the desalting process at atmospheric pressure (0.1 MPa) and under pressure (200 MPa). In the trials carried out to optimize the desalting process, it was verified that: (a) the application of successive cycles of 5 minutes of desalting at 200 MPa, with water change and with two vacuum levels (55 and 85%), did not improve the desalting process, in terms of the amounts of diffused salt and water; (b) desalting for 30 minutes, followed by desalting for 5 seconds/1 minute at 200 MPa, after water desalting change, yielded no significant improvements in the results. However,, but leaving the sample to stand for 60 minutes after the first desalting, it is possible to obtain a salt reduction of 65% (compared with 35% obtained in desalting only at 200 MPa). This possible process of desalting optimization should be subject of further studies.

During the desalting of cod fish at 0.1 MPa, it was observed: that the soluble protein decreased with the desalting time, due to solubilization in the desalting water; an increase in pH, being this more pronounced at 20°C than at 4°C; that the activity of the enzymes, acid phosphatase, cathepsin B and cathepsin D, decreased over time (being more pronounced for desalting at 20°C), while lipase activity increases throughout the process, being more evident for desalting cod at 20°C.

Finally, the effect of high-pressure treatments on the enzymatic activity of mackerel were studied, aiming to inactivate enzymes involved in the degradation of fish muscle, to reduce the activity of these enzymes during the frozen storage. It was possible to conclude that pressure, pressurization time, and storage time have an effect on the enzymatic activity of mackerel muscle. The effect of high pressure was less pronounced in the case of acid phosphatase activity. For cathepsin B it was observed that there is a tendency to its activity to decrease for higher pressures (450 MPa) for samples analyzed immediately after freezing (month 0), being observed an increase along the storage time. For cathepsin D it was observed that at 300 MPa the activity increases, being this result attributed to the release of the enzyme from lysosomes due to its disruption by pressure. Lipase was more affected by pressure that a greater decrease of activity at 450 MPa at 0 months and the activity increased with storage time.

---

## **Índice**

Capítulo I - Revisão bibliográfica .....	1
A. Pescado .....	1
1. Composição química .....	1
1.1. Lípidos.....	2
1.2. O músculo do peixe.....	3
1.2.1. Proteínas musculares.....	3
a. Proteínas miofibrilares .....	4
b. Proteínas sarcoplasmáticas .....	5
c. Proteínas do estroma.....	5
1.2.2. Enzimas .....	6
a. Proteases.....	6
I. Proteases lisossomais: catepsinas.....	6
b. Lipases.....	7
c. Outras enzimas .....	8
2. Deterioração do peixe .....	8
2.1. Deterioração microbiológica .....	9
2.2. Deterioração química .....	9
2.3. Deterioração enzimática.....	10
B. Bacalhau .....	12
1. O processamento do bacalhau .....	14
2.1. A salga e a seca do bacalhau .....	15
2.1.1. Alterações bioquímicas após a salga e a seca .....	16
2.2. A demolha do bacalhau.....	18
2.2.1. Cinética de transferência de massa durante a demolha .....	19
C. Tecnologia de alta pressão .....	20
1. Efeito da alta pressão nos lípidos .....	22
2. Efeito da alta pressão nos microrganismos .....	22
3. Efeito da alta pressão nas proteínas e enzimas .....	22
4. Efeito da alta pressão na difusão de componentes em alimentos .....	24
D. enquadramento do trabalho e objetivos .....	25



---

Capítulo II - Metodologia experimental .....	29
Parte I. Efeito da alta pressão no processo de demolha do bacalhau.....	29
A. Preparação das amostras de bacalhau.....	29
B. Ensaio de demolha de bacalhau .....	29
1. Demolha à pressão atmosférica (0,1 MPa).....	29
2. Demolha sob alta pressão (200 MPa).....	30
3. Ensaio de otimização da demolha do bacalhau .....	31
C. Determinação do conteúdo em H <sub>2</sub> O .....	33
D. Determinação do conteúdo em NaCl .....	33
1. Método condutivimétrico .....	33
2. Método de Volhard.....	34
E. Atividade enzimática, proteína solúvel e pH .....	34
1. Quantificação da atividade enzimática.....	35
1.1. Atividade da fosfatase ácida.....	35
1.2. Atividade da catepsina B .....	35
1.3. Atividade da catepsina D .....	36
1.4. Atividade da lipase .....	36
2. Quantificação da proteína solúvel.....	37
3. Análise estatística .....	38
Parte II. Efeito da alta pressão na atividade enzimática da cavala.....	38
A. Preparação das amostras de peixe.....	38
B. Preparação dos extratos enzimáticos .....	39
C. Quantificação da atividade enzimática.....	39
Capítulo III – Análise e discussão dos resultados .....	41
Parte I. Efeito da alta pressão no processo de demolha do bacalhau.....	41
A. Ensaio de demolha de bacalhau salgado seco .....	41
1. Quantidade de NaCl e H <sub>2</sub> O no bacalhau salgado seco .....	41
2. Demolha de bacalhau a pressão atmosférica (0,1 MPa) .....	42
2.1. Efeito do parâmetro $\alpha$ a pressão atmosférica (0.1 MPa) .....	42
2.2. Efeito do embalamento a vácuo no processo de demolha de bacalhau à 0.1 MPa .....	43
3. Demolha de bacalhau sob alta pressão (200 MPa) .....	44

---

3.1. Efeito do parâmetro $\alpha$ no processo de demolha de bacalhau a 200 MPa .....	44
3.2. Efeito do embalamento a vácuo no processo de demolha de bacalhau a 200 MPa .....	45
4. Comparação entre a demolha de bacalhau a 0,1 e 200 MPa .....	47
5. Ensaio de otimização da demolha do bacalhau .....	48
6. Variação da proteína solúvel, pH e atividade enzimática ao longo do processo de demolha de bacalhau .....	51
6.1. Variação da proteína solúvel no processo de demolha de bacalhau....	52
6.2. Variação do pH no processo de demolha de bacalhau .....	54
6.3. Variação da atividade enzimática no processo de demolha de bacalhau .....	56
6.3.1. Fosfatase ácida .....	56
6.3.2. Catepsina B .....	57
6.3.3. Catepsina D .....	59
6.3.4. Lipase .....	60
Parte II. Efeito da alta pressão na atividade enzimática da cavala .....	62
A. Atividade enzimática na cavala .....	62
1. Atividade da fosfatase ácida .....	62
2. Atividade da catepsina B .....	64
3. Atividade da catepsina D .....	66
4. Atividade da lipase .....	68
Capítulo IV – Conclusão .....	71
Trabalho futuro .....	73
Referências bibliográficas .....	75
Anexos .....	81

---

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Organização estrutural do tecido muscular de peixe (adaptado de Thorarinsdottir, 2010) .....	5
<b>Figura 2</b> – As reações sucessivas da principal via de degradação de nucleótidos no peixe (adaptado de Hui, 2006) .....	11
<b>Figura 3</b> – Representação do bacalhau do atlântico, <i>Gadus morhua</i> (adaptado de Helfman, 2009) .....	13
<b>Figura 4</b> – Fotografia do bacalhau do atlântico ( <i>Gadus morhua</i> ), na forma de salgado seco (adaptado de <a href="http://www.mardanoruega.com/Bacalhau+da+Noruega">http://www.mardanoruega.com/Bacalhau+da+Noruega</a> (2008)) .....	13
<b>Figura 5</b> – Variação da quantidade de sal durante o processo de salga e demolha do bacalhau (adaptado de Lorentzen, 2010) .....	15
<b>Figura 6</b> – Processo de difusão. As setas vermelhas correspondem à difusão de sal e setas azuis à difusão de água (adaptado de Thorarinsdottir, 2010) .....	20
<b>Figura 7</b> – O princípio de processamento isostático (adaptado de Rahman, 2007) .....	21
<b>Figura 8</b> – Imagem fotográfica de: A – Sacos de plástico em polietileno (PE) utilizados na demolha para $\alpha=2$ , B – frascos em PE utilizados na demolha para $\alpha=9$ .....	30
<b>Figura 9</b> - Imagem fotográfica do aparelho de alta pressão utilizado no trabalho experimental.....	30
<b>Figura 10</b> – Ensaio realizados para otimização do processo de demolha de bacalhau: <i>Ensaio 1a e 1b</i> .....	31
<b>Figura 11</b> – Ensaio realizados para otimização do processo de demolha de bacalhau: <i>Ensaio 2a e 2b</i> .....	32
<b>Figura 12</b> – Ensaio controlo realizados para otimizados do processo de demolha de bacalhau: <i>Controlos 1 e 2</i> referentes ao <i>Ensaio 2b</i> .....	32
<b>Figura 13</b> – Variação da quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl de água e sal ao longo do processo de demolha de bacalhau, a temperatura ambiente e pressão	

atmosférica. Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl .....	43
<b>Figura 14</b> - Variação da quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl ao longo do processo de demolha do bacalhau para diferentes níveis de vácuo (sem vácuo, 55% e 85%) para $\alpha=2$ a pressão atmosférica. Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl .....	44
<b>Figura 15</b> - Variação da quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl ao longo do processo de demolha, utilizando 85% de vácuo, a 200 MPa. Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl.....	45
<b>Figura 16</b> - Variação da quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl ao longo do processo de demolha, utilizando dois níveis de vácuo, 55 e 85%, para $\alpha=2$ , sob alta pressão.....	45
<b>Figura 17</b> – Variação da quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl em mf/mi (relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl), ao longo da demolha a 200 MPa até os 3 minutos, para um $\alpha=9$ e para um nível de vácuo de 30% .....	46
<b>Figura 18</b> - Variação da quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl em mf/mi (relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl), ao longo da demolha a 200 MPa até os 3 minutos, para um $\alpha=9$ e para um nível de vácuo de 55% .....	46
<b>Figura 19</b> - Variação da quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl em mf/mi (relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl), ao longo da demolha a 200 MPa até os 3 minutos, para um $\alpha=9$ e para um nível de vácuo de 85% .....	47
<b>Figura 20</b> – Quantidade de água ao longo do processo de demolha para $\alpha=9$ a 200 MPa e 0,1 MPa (pressão atmosférica). O ensaio sob alta pressão foi anteriormente embalado a 85% de vácuo. Mf/mi (relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl) .....	48
<b>Figura 21</b> - Quantidade de sal ao longo do processo de demolha para $\alpha=9$ a 200 MPa e 0,1 MPa (pressão atmosférica). O ensaio sob alta pressão foi anteriormente embalado a 85% de vácuo. Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl .....	48
<b>Figura 22</b> – Variação da proteína solúvel (mg proteína solúvel/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha a 4 e 20°C .....	53

---

<b>Figura 23</b> – Variação do pH ao longo do processo de demolha de bacalhau, a 4 e 20°C .....	55
<b>Figura 24</b> – Variação da atividade da fosfatase ácida (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha .....	56
<b>Figura 25</b> – Variação da atividade da catepsina B no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha .....	58
<b>Figura 26</b> – Variação da atividade da catepsina D (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha .....	59
<b>Figura 27</b> – Variação da atividade da lipase (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha .....	60
<b>Figura 28</b> - Atividade da fosfatase ácida (U/g músculo de peixe) nos diferentes tratamentos (pressão/tempo) nas amostras de cavala. NP: Não processada. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização .....	62
<b>Figura 29</b> – Atividade da catepsina B (U/g músculo de peixe) nos diferentes tratamentos (pressão/tempo) nas amostras de cavala. NP: não processada. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização .....	64
<b>Figura 30</b> - Atividade da catepsina D (U/g músculo de peixe) nos diferentes tratamentos (pressão/tempo) nas amostras de cavala. NP: Não processado. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização .....	66
<b>Figura 31</b> - Atividade da lipase (U/g músculo de peixe) nos diferentes tratamentos (pressão/tempo) nas amostras de cavala. NP: Não processado. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização.....	68
<b>Figura 32</b> - Condutividade em função da concentração de NaCl (%) a temperatura ambiente.....	82

---

<b>Figura 33</b> - Gama linear da condutividade em função da concentração de NaCl (%).....	82
<b>Figura 34</b> - Correlação entre o método de Volhard e o método condutivimétrico para a determinação da percentagem de NaCl.....	83
<b>Figura 35</b> - Variação da quantidade no músculo do bacalhau durante o processo de demolha a 4º e 20ºC. Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl.....	93
<b>Figura 36</b> – Curva de calibração para a determinação da proteína solúvel.....	94
<b>Figura 37</b> – Curva de calibração da tirosina .....	97

---

## **Índice de tabelas**

<b>Tabela 1</b> – Composição média de alguns peixes (adaptado de Belitz, 2009).....	2
<b>Tabela 2</b> - Distribuição da fração de proteína no músculo (adaptado de Haard, 1992) .....	3
<b>Tabela 3</b> – Principais métodos de salga utilizados no processamento do bacalhau (adaptado de Lauritzsen, 2004; Lorentzen et al., 2010a; Thorarinsdottir, 2010; Thorarinsdottir et al., 2004).....	16
<b>Tabela 4</b> – Principais referências bibliográficas sobre o efeito do processamento de alta pressão em algumas enzimas em peixe.....	24
<b>Tabela 5</b> - Diferentes tratamentos realizados nas amostras de cavala.....	38
<b>Tabela 6</b> - Percentagem de NaCl na amostra de bacalhau salgado seco, obtida pelos dois métodos.....	41
<b>Tabela 7</b> – Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha com $\alpha=9$ : <i>Ensaio 1a</i> . Resultados expressos em mf/mi (relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl) .....	49
<b>Tabela 8</b> - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha com $\alpha=9$ : Ensaio 1b. Resultados expressos em mf/mi (relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl) .....	50
<b>Tabela 9</b> - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha: Ensaio 2a. Resultados expressos em mf/mi (relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl) .....	50
<b>Tabela 10</b> - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha com $\alpha=9$ : Ensaio 2b. Resultados expressos em mf/mi (relação massa final e massa inicial de H <sub>2</sub> O e NaCl).....	51
<b>Tabela 11</b> – Valores obtidos para a quantidade de proteína solúvel (mg proteína solúvel/gSI) no músculo de bacalhau ao longo do processo de demolha a 4 e 20°C.....	52
<b>Tabela 12</b> – Proteína solúvel na água de demolha (20°C).....	53
<b>Tabela 13</b> - Variação do pH no processo de demolha de bacalhau.....	54

---

<b>Tabela 14</b> – Variação da atividade da fosfatase ácida (U/gSI) durante o processo de demolha de bacalhau .....	56
<b>Tabela 15</b> - Variação da atividade da catepsina B (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha.....	58
<b>Tabela 16</b> - Variação da atividade da catepsina D (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha.....	59
<b>Tabela 17</b> - Variação da atividade da lipase (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha .....	60
<b>Tabela 18</b> – Valores obtidos para a atividade da fosfatase ácida (U/g músculo de peixe) para as diferentes pressões (MPa) e tempos de pressurização (minutos) para o mês 0, 1 e 3 de conservação. NP: Não processada. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização.....	63
<b>Tabela 19</b> - Valores obtidos para a atividade da fosfatase ácida (U/g músculo de peixe) ao longo do tempo de conservação. NP: Não processada. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização.....	64
<b>Tabela 20</b> – Valores obtidos para a atividade da catepsina B (U/g músculo de peixe) para as diferentes pressões (MPa) e tempos de pressurização (minutos) para o mês 0, 1 e 3 de conservação. NP: Não processado. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização.....	65
<b>Tabela 21</b> - Valores obtidos para a atividade da catepsina B (U/g músculo de peixe) ao longo do tempo de conservação. NP: Não processada. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização.....	66
<b>Tabela 22</b> - Valores obtidos para a atividade da catepsina D (U/g músculo de peixe) para as diferentes pressões (MPa) e tempos de pressurização (minutos) para mês 0, 1 e 3 de conservação. NP: Não processado. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização.....	67



---

<b>Tabela 23</b> - Valores obtidos para a atividade da catepsina D (U/g músculo de peixe) ao longo do tempo de conservação. NP: Não processado. Controle: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização.....	68
<b>Tabela 24</b> - Valores obtidos para a atividade da lipase (U/g músculo de peixe) para as diferentes pressões (MPa) e tempos de pressurização (minutos) para mês 0, 1 e 3 de conservação. NP: Não processado. Controle: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização.....	69
<b>Tabela 25</b> - Valores obtidos para a atividade da lipase (U/g músculo de peixe) ao longo do tempo de conservação. NP: Não processado. Controle: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização.....	70
<b>Tabela 26</b> - Valores de condutividade em mS/cm para soluções padrões de NaCl, a temperatura ambiente .....	81
<b>Tabela 27</b> - Valores de conteúdo em NaCl nas soluções padrão determinados através dos dois métodos.....	83
<b>Tabela 28</b> - Valores da condutividade (mS/cm) da água de demolha ao longo do processo de demolha de bacalhau para $\alpha=2$ .....	84
<b>Tabela 29</b> – Valores de quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl ao longo do processo de demolha do bacalhau para $\alpha=2$ .....	84
<b>Tabela 30</b> - Valores da condutividade (mS/cm) da água de demolha ao longo do processo de demolha de bacalhau para $\alpha=9$ .....	85
<b>Tabela 31</b> - Valores de quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl ao longo do processo de demolha do bacalhau para $\alpha=9$ .....	85
<b>Tabela 32</b> – Valores de quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl em g/gSI, percentagem e massa final/massa inicial para pressão atmosférica, sem sujeitar a vácuo, e $\alpha$ igual a 2 .....	86
<b>Tabela 33</b> - Valores de quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl em g/gSI, percentagem e massa final/massa inicial para pressão atmosférica, para um nível de vácuo de 55%, e $\alpha$ igual a 2 .....	86

---

<b>Tabela 34</b> - Valores de quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl em g/gSI, percentagem e massa final/massa inicial para pressão atmosférica, para um nível de vácuo de 85%, e $\alpha$ igual a 2 .....	87
<b>Tabela 35</b> – Quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl para alfa igual a 2, com vácuo a 85% ..	88
<b>Tabela 36</b> – Quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl para alfa igual a 9, com vácuo a 85% ..	88
<b>Tabela 37</b> – Valores em massa final/massa inicial para dois níveis de vácuo, 55 e 85%, para $\alpha$ igual a 2, sob alta pressão (200 MPa).....	89
<b>Tabela 38</b> – Quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl para alfa igual a 9, com 30% vácuo .....	89
<b>Tabela 39</b> - Quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl para alfa igual a 9, com 55% vácuo .....	90
<b>Tabela 40</b> - Quantidade de H <sub>2</sub> O e NaCl para alfa igual a 9, com 85% vácuo .....	90
<b>Tabela 41</b> - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha: Ensaio 1a .....	91
<b>Tabela 42</b> - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha: Ensaio 1b .....	91
<b>Tabela 43</b> - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha: Ensaio 2a .....	92
<b>Tabela 44</b> - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha: Ensaio 2b .....	92
<b>Tabela 45</b> – Valores obtidos para quantidade de NaCl e H <sub>2</sub> O .....	93
<b>Tabela 46</b> - Valores obtidos para a curva de calibração na quantificação da proteína solúvel pelo método de Biureto .....	94
<b>Tabela 47</b> – Valores obtidos para a quantidade de proteína solúvel no músculo de bacalhau ao longo do processo de demolha a 4 e 20°C .....	94
<b>Tabela 48</b> – Valores obtidos para a atividade da fosfatase ácida durante o processo de demolha de bacalhau.....	96
<b>Tabela 49</b> - Valores obtidos para a atividade da catepsina B durante o processo de demolha de bacalhau .....	96
<b>Tabela 50</b> – Valores obtidos para a curva de calibração da tirosina.....	96
<b>Tabela 51</b> - Valores obtidos para a atividade da catepsina D durante o processo de demolha de bacalhau .....	97
<b>Tabela 52</b> - Valores obtidos para a atividade da lipase durante o processo de demolha de bacalhau .....	97

---

## **Capítulo I - Revisão bibliográfica**

### **A. Pescado**

O peixe desempenha um papel importante na alimentação humana, como fonte de proteínas biologicamente importantes, gordura e vitaminas lipossolúveis (Belitz, Grosch & Schieberle, 2009) e é apreciado mundialmente pelos seus distintos sabores (Zare, 2004).

A aceitação dos produtos de peixe pelos consumidores depende de vários atributos da sua qualidade alimentar. Estes atributos são importantes e incluem a segurança alimentar, a frescura, a nutrição, o sabor e a cor (especialmente em espécies pigmentadas) (Hultmann, 2004).

#### **1. Composição química**

A porção comestível do peixe é menor do que a de animais de sangue quente. O total de resíduos é de 50%, mas pode chegar a 10-15% excluindo a cabeça. A perda durante o cozimento é de aproximadamente 15%, significativamente menor do que a da carne (Belitz et al., 2009).

Os lípidos desempenham um papel nutricional muito importante nos peixes, mas também contribuem para mudanças na qualidade em muitas espécies. O conteúdo lipídico e os tipos de ácidos gordos variam entre espécies e até dentro da mesma espécie (Hui, 2006). O conteúdo em lípidos varia aproximadamente de 0,2 a 25% (Burgaard, 2010). Alguns peixes contêm pouca gordura, como é o caso do bacalhau, enquanto outros são gordos, como por exemplo as enguias, a cavala ou o atum (Hui, 2006).

O valor biológico das proteínas do peixe é semelhante ao de animais terrestres. O teor de proteína bruta de peixe é de aproximadamente 17-20%, enquanto que o teor de gordura e água variam bastante (Belitz et al., 2009), perfazendo no seu conjunto os restantes 80% (Burgaard, 2010).

Na Tabela 1 pode observar-se a composição média de alguns peixes. Observa-se que o bacalhau é o que apresenta maior teor em humidade, mas menor conteúdo em gordura, confirmando o que se referiu anteriormente. A cavala e o atum apresentam menor teor em humidade, mas a percentagem em proteínas e gordura é superior a do bacalhau.

**Tabela 1** – Composição média de alguns peixes (adaptado de Belitz, 2009)

Peixe	Humidade*	Proteínas*	Gordura*	Minerais*	Porção comestível**
Bacalhau	82	17	0,64	1,2	75
Pescada	79	17	2,5	1,1	58
Sardinha	74	19	5	1,6	59
Atum	62	22	16	1,1	61
Cavala	68	19	12	1,3	62
Salmão	66	20	14	1,0	64

\*Como percentagem de porção comestível

\*\*Como percentagem de peso total de peixe

A composição química do peixe varia consideravelmente mesmo dentro da mesma espécie, devido ao tamanho do peixe e à idade, tempo de captura, estado nutricional e maturação sexual do peixe (Hultmann, 2004).

## 1.1. Lípidos

A composição em lípidos não depende apenas do tipo de peixe, mas da sua maturidade, da estação e da alimentação. Os peixes podem ser classificados em quatro categorias baseados no conteúdo em lípidos, podendo ser: espécies magras (por exemplo, o bacalhau), que têm um teor em lípidos inferior a 2%; espécies de baixo teor em gordura (por exemplo, a albacora), que têm um conteúdo em lípidos entre 2 e 4%; espécies de gordura média (por exemplo, o salmão) que possuem entre 4-8% de lípidos totais; e espécies gordas (por exemplo, a cavala) que têm mais de 8% de lípidos totais (Burgaard, 2010; Hui, 2006).

A deposição de gordura ocorre no tecido muscular, no fígado ou nos intestinos. O peixe é uma fonte importante de ácidos gordos  $\omega$ -3 com 5 e 6 ligações duplas (ácidos gordos polinsaturados - PUFA), que são considerados

muitos importantes do ponto de vista fisiológico e nutricional. No entanto, o nível de tocoferóis com propriedades antioxidantes é relativamente baixo (Belitz et al., 2009).

## 1.2. O músculo do peixe

O teor em proteínas no tecido muscular dos peixes é elevado, contendo os tipos e proporções de aminoácidos que são semelhantes aos necessários para o crescimento e manutenção do organismo humano. Do teor total de azoto do músculo, cerca de 95% é de proteína e 5% de péptidos, aminoácidos livres e outros compostos azotados (Lauritzsen, 2004).

### 1.2.1. Proteínas musculares

O músculo do peixe é uma estrutura bastante complexa, composta maioritariamente por proteínas miofibrilares (70-90%), sendo as principais a actina e a miosina. Para além destas, existem as proteínas sarcoplasmáticas (10-25%), isto é, as proteínas solúveis no citoplasma das células musculares, que são maioritariamente enzimas e mioglobina. Em menor quantidade (entre 3 a 10%) existem as proteínas do tecido conjuntivo, também denominadas de proteínas do estroma, que são constituídos essencialmente por colagénio e elastina (Alasalvar & Taylor, 2002; Burgaard, 2010). O músculo do peixe contém uma concentração relativamente elevada de proteínas miofibrilares e uma baixa concentração de proteínas do estroma (Tabela 2).

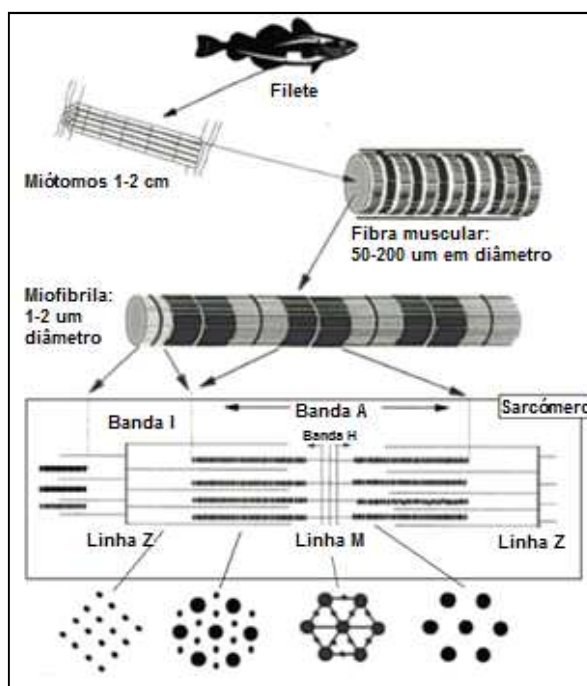
**Tabela 2** - Distribuição da fração de proteína no músculo (adaptado de Haard, 1992)

Fonte	Proteínas sarcoplasmáticas (%)	Proteínas miofibrilares (%)	Proteínas do estroma (%)
Peixe (geral)	10-25	70-90	3-10
Bacalhau atlântico	21	76	3
Carpa	24	71	5
Linguado	21	76	3
Carne de vaca	16-28	39-68	16-28

**a. Proteínas miofibrilares**

As proteínas miofibrilares mais abundantes do músculo do peixe são a miosina e actina, também existindo em quantidades menores a tropomiosina, a troponina e a paramiosina (Belitz et al., 2009).

Na Figura 1 pode observar-se a organização estrutural de um filete de peixe macroscópica e microscopicamente, conseguindo-se observar segmentos musculares denominados de miótomos, que são constituídos por fibras musculares. No interior da fibra muscular observam-se como componentes principais, as miofibrilas, estruturas cilíndricas existentes no sarcoplasma que constituem o aparelho contráctil. Na Figura 1 está também representada a estrutura básica do músculo estriado, o sarcómero. Este é composto de filamentos grossos (miosina) e finos (actina) longitudinais, e corresponde ao espaço separado por duas linhas (ou discos) Z consecutivas. De cada lado da linha Z encontra-se uma banda clara, denominada banda I, composta por filamentos finos de actina. Entre a banda I encontra-se a banda A, mais escura devido à sobreposição dos filamentos finos de actina com os grossos de miosina. No centro da banda A está a linha M, e a circundá-la encontra-se uma faixa estreita, mais clara, designada de banda H, onde se encontram os filamentos de miosina. Os filamentos finos estendem-se para fora a partir dos discos Z em ambos os sentidos. O estado contráctil do músculo tem uma influência importante sobre o tamanho destas diversas bandas e zonas. Durante a contração, o comprimento da banda A permanece constante, mas a banda I e a zona H encurtam. Os filamentos finos estão ligados ao disco Z, servindo como âncora durante o processo de contração muscular (Alasalvar et al., 2002; Lauritzsen, 2004).



**Figura 1** – Organização estrutural do tecido muscular de peixe (adaptado de Thorarinsdottir, 2010)

### **b. Proteínas sarcoplasmáticas**

As proteínas sarcoplasmáticas são proteínas solúveis no sarcoplasma das células musculares. Elas incluem um largo número de proteínas como a mioglobina, enzimas (hidrolases, oxidorredutases e transferases) e outras albuminas. As enzimas sarcoplasmáticas são responsáveis pela deterioração da qualidade do peixe depois da morte e antes da degradação bacteriana (Hui, 2006).

### **c. Proteínas do estroma**

O teor em proteínas do estroma (ou proteínas do tecido conjuntivo) no músculo dos peixes é menor do que em músculos de mamíferos, como já se tinha observado para as proteínas miofibrilares (Belitz et al., 2009).

O tecido conjuntivo do peixe consiste em várias fibras, diversos tipos de células diferentes e substâncias amorfas (hidratos de carbono, proteínas e lípidos). As proteínas mais importantes do tecido conjuntivo são o colagénio, a



elastina e as lipoproteínas da membrana celular (Thorarinsdottir, 2010). De toda a estrutura fibrosa, o colagénio é a proteína predominante, com um teor de até 90% (Belitz et al., 2009). Uma fina rede de colagénio rodeia cada fibra de músculo e prossegue até ao miótomo. As ligações cruzadas intermoleculares no colagénio são as responsáveis pela estabilidade, força física e propriedades mecânicas do tecido conjuntivo e outros componentes da matriz extracelular (Hultmann, 2004). Existem vários tipos de colagénios com diferentes características bioquímicas, sendo os mais importantes: colagénio tipo I e tipo V (Delbarre-Ladtrat, Cheret, Taylor & Verrez-Bagnis, 2006).

### **1.2.2. Enzimas**

Existe uma enorme variedade de enzimas no músculo, desempenhando um papel importante nas funções do músculo *in vivo*, mas tendo também um papel importante nas alterações bioquímicas, como a proteólise e lipólise, que ocorrem no músculo no período *postmortem* ou durante o processamento do peixe (Hui, 2006).

#### **a. Proteases**

Tanto a composição em proteínas como em enzimas variam entre espécies ou dentro da mesma espécie, mas também podem variar com a temporada de captura do peixe, o que pode ser refletido na taxa de variação de amaciamento do músculo (Delbarre-Ladtrat et al., 2006).

#### **I. Proteases lisossomais: catepsinas**

As catepsinas são proteases presentes nos lisossomas que degradam as proteínas de modo não seletivo (Hui, 2006). Os lisossomas são organelos intracelulares que contêm uma larga quantidade de enzimas hidrolíticas e desempenham um papel digestivo na célula (Hultmann, 2004). As catepsinas

mais importantes são as catepsinas B, H e L (proteases cisteínicas), e catepsina D (protease aspártica). O pH ótimo para a atividade é ligeiramente ácido (ca. 6,0) para as catepsinas B e L, ácido (ca. 4,5) para a catepsina D, e neutro (pH 6,8) para catepsina H (Hui, 2006).

A ação hidrolítica das catepsinas contribui para a degradação da textura do músculo do peixe. As catepsinas D e L atuam particularmente na cadeia pesada da miosina, titina, proteínas C e M, tropomiosina, e troponinas T e I. A catepsina L é extremamente ativa na degradação da titina e nebulina. A catepsina B é capaz de degradar a cadeia pesada da miosina. No músculo há inibidores endógenos das proteases cisteínicas, denominadas de cistatinas (Hui, 2006).

A catepsina B pode atuar na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, glutatona, ditioneitol e cisteína, mas também pode ser inibida na presença de outros compostos, como antipáina e ácido iodoacético. Alguns iões metálicos inibem a atividade da catepsina B, como o  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , devido a alta afinidade com os grupos SH da enzima (Jiang, Lee & Chen, 1994).

## **b. Lipases**

As lipases são caracterizadas por catalisar a hidrólise de ligações éster dos triglicerídeos, fosfolípidos e ésteres de colesterol. O pH ótimo para estas enzimas é entre 6,5-8,5 (Kurtovic, Marshall, Zhao & Simpson, 2009). Várias partes do peixe são fontes ricas em lipase, principalmente a cabeça e as vísceras. Estudos realizados observaram que a atividade da lipase na *Labeo rohita*, sardinha e tainha é superior no intestino e estômago, e na cavala é superior no músculo (Nayak, Viswanathan, Ammu & Mathew, 2003).

A lipase ácida e a fosfolipase ácida estão localizadas nos lisossomas. Ambas as enzimas têm um pH ótimo ácido (4,5-5,5) e são responsáveis pela formação de ácidos gordos livres de cadeia longa.

As esterases são responsáveis pela formação de ácidos gordos de cadeia curta a partir de tri-, di- e monoglicerídeos. A esterase ácida está localizada nos lisossomas, enquanto a esterase neutra se encontra no citoplasma. (Hui, 2006).

### **c. Outras enzimas**

As fosfatases são muito importantes na regulação de vários processos metabólicos que ocorrem por fosforilação (Kuda, Matsumoto & Yano, 2002). A fosfatase ácida está localizada nos lisossomas, sendo que 40-60% está associada às membranas dos lisossomas. Desta forma, a deteção da atividade da fosfatase ácida pode ser utilizada como indicadora de libertação de enzimas lisossomais devido ao rompimento das membranas dos lisossomas (Cheret, Delbarre-Ladrat, de Lamballerie-Anton & Verrez-Bagnis, 2005; Ohmori, Shigehisa, Taji & Hayashi, 1992; Ohsumi, Ishikawa & Kato, 1983).

As collagenases são metaloproteases que podem atuar no tecido conjuntivo do músculo do peixe, provocando alterações indesejáveis na textura (Hultmann, 2004).

As calpaínas são endopeptidases cisteínicas que estão localizadas no sarcoplasma do músculo, em redor da linha Z. As calpaínas são dependentes de cálcio para serem ativas, apresentando atividade máxima a pH 7,5. A sua atividade diminui com uma pequena diminuição do pH para 6,0, sendo completamente inativa a pH 5,5. As calpaínas têm boa capacidade de degradar algumas proteínas miofibrilares, mas não degradam algumas proteínas como, a miosina e actina. A calpastatina é um polipeptídeo que atua como inibidor endógeno reversível e competitivo das calpaínas no músculo vivo (Hui, 2006; Hultmann, 2004).

## **2. Deterioração do peixe**

A perda da frescura do peixe é devida à combinação de vários processos físicos, químicos, biológicos e bioquímicos. A deterioração microbiológica, química e enzimática resultam em desnaturação/hidrólise de proteínas, oxidação lipídica e formação de compostos que conferem odor e sabor desagradável ao peixe como também alterações na textura (Delbarre-Ladrat et al., 2006; Zare, 2004).

Durante o armazenamento do peixe congelado também ocorrem alterações organoléticas que se devem a vários fatores, tais como: a formação de cristais de gelo, desidratação, oxidação lipídica e quebra enzimática do N-óxido de trimetilamina (TMAO) (Hultmann, 2004).

### **2.1. Deterioração microbiológica**

Os constituintes do peixe (por exemplo, hidratos de carbono, proteínas e lípidos) servem como substrato para a proliferação de microrganismos presentes no peixe, que juntamente com enzimas endógenas, produzem compostos de sabor desagradável, provocam a deterioração da textura, descoloração e outras alterações adversas no músculo do peixe (Zare, 2004).

Muitas bactérias têm a capacidade de reduzir o TMAO a trimetilamina (TMA), através da enzima N-óxido de trimetilamina redutase (TMAO redutase). A atividade desta enzima é que provoca o odor a peixe estragado, sendo um bom indicador da deterioração microbiológica dos peixes. O TMAO também é um precursor da formação de dimetilamina (DMA) e formaldeído, sendo a reação catalisada pela enzima N-óxido de trimetilamina aldolase (TMAO aldolase). A DMA é uma amina secundária com odor mais suave que a TMA, no entanto, o formaldeído é altamente reativo e afeta fortemente a textura da carne de peixe, tornando-a mais dura, fibrosa e menos suculenta (Hui, 2006; Zare, 2004).

Os microrganismos também têm a capacidade de produzir proteases que provocam a degradação de proteínas do músculo no peixe, sendo posteriormente os produtos utilizados como substratos (Lee & Chang, 1990; Zare, 2004).

### **2.2. Deterioração química**

A deterioração química do peixe pode acontecer por hidrólise ou oxidação de compostos presentes no músculo provocando alterações sensoriais e nutricionais que muitas vezes são desagradáveis para o consumidor. As principais consequências são: perda de água, vitaminas e proteínas importantes, alteração

de odor e sabor por formação de compostos voláteis e formação de ranço (Zare, 2004).

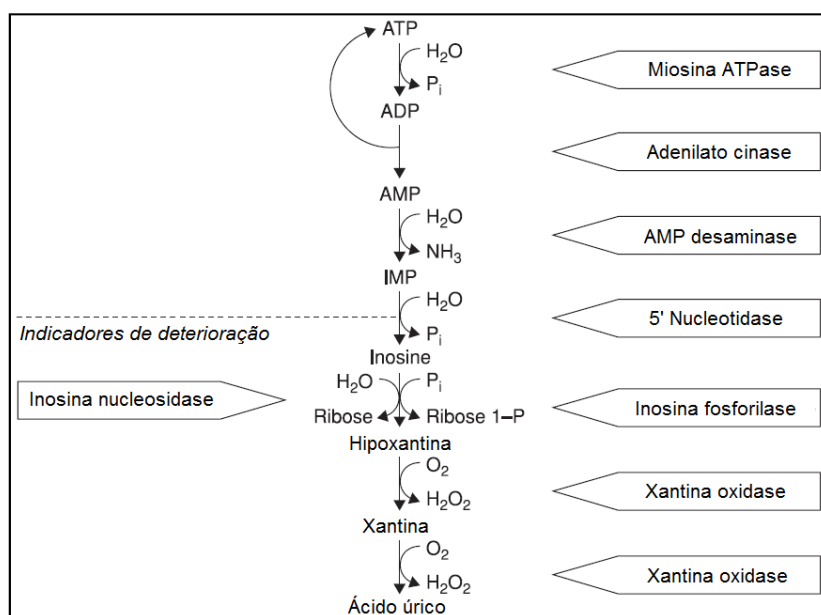
A deterioração química dos lípidos pode acontecer por acastanhamento não-enzimático ou rancidez (hidrolítica ou oxidativa). O acastanhamento não-enzimático provoca alteração na cor do músculo e basicamente deve-se a reação entre lípidos oxidados e proteínas. A rancidez hidrolítica deve-se a ação de agentes químicos que hidrolisam as ligações éster nos lípidos, formando ácidos gordos livres saturados ou insaturados; enquanto a rancidez oxidativa envolve a oxidação dos ácidos gordos insaturados que estão presente nos lípidos, pela via da formação de radicais livres. A oxidação dos lípidos é afetada por vários fatores: grau de saturação dos ácidos gordos, temperatura, luz, atividade da água e pH. A oxidação dos lípidos também pode ser afetada por substâncias conhecidas por pro-oxidantes, que têm a capacidade de acelerar o processo de oxidação. Substratos como os aminoácidos, compostos hémicos, ácidos orgânicos e pigmentos são capazes de catalisar a reação de oxidação em associação com alguns iões (sendo os mais importantes:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Hui, 2006; Zare, 2004).

### **2.3. Deterioração enzimática**

As reações de autólise ocorridas nos peixes no período *postmortem* podem dever-se a enzimas sintetizadas no tecido muscular e segregadas na matriz extracelular, como também podem ser causadas por enzimas sintetizadas no intestino após manuseamento do peixe morto. Processos como proteólise, glicólise, hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) e hidrólise/oxidação lipídica são as principais reações autolíticas que causam deterioração da qualidade do peixe (Zare, 2004).

Após a morte do peixe, a paragem da corrente sanguínea provoca a diminuição do oxigénio no músculo, pelo que cessa a glicólise aeróbia e começa a anaeróbia (via fermentativa). Neste processo, as reservas de glicogénio são usadas para produção de ATP. No período inicial *postmortem*, o ATP pode ser regenerado a partir do ADP pela enzima creatina fosfato, no entanto, quando as

reservas de glicogénio se esgotam a quantidade de ATP começa a diminuir. Sem ATP, o músculo permanece contraído, pois não há reservas de energia para o relaxamento, pelo que a actina e a miosina se mantêm ligadas (actomiosina), o músculo perde elasticidade e entra em *rigor mortis*. A formação de ácido láctico devido à glicólise anaeróbia, provoca a sua acumulação no músculo e consequente diminuição do pH, de aproximadamente 7,2, para valores de pH mais ácidos (5,3-5,8). Esta diminuição do pH provoca alterações organoléticas do músculo do peixe, uma vez que induz a ativação de enzimas digestivas. Por outro lado, muitas enzimas começam a participar na hidrólise do ATP à adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), guanosina monofosfato (GMP) seguido por uma reação mais lenta que transforma IMP à inosina. A degradação contínua destes nucleosídeos, devido a presença de enzimas tanto autolíticas como bacterianas, provocam a formação de outros compostos como hipoxantina (Hx), xantina e ácido úrico (Figura 2) (Al-Omirah, 1996; Hamada-Sato, Usui, Kobayashi, Imada & Watanabe, 2005; Zare, 2004).



**Figura 2** – As reações sucessivas da principal via de degradação de nucleótidos no peixe (adaptado de Hui, 2006)

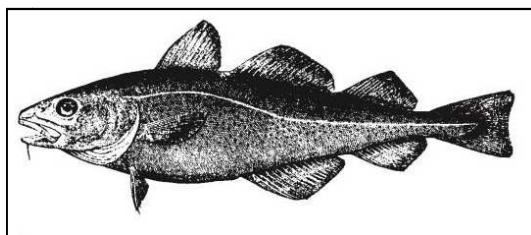
A deterioração das mitocôndrias e do retículo endoplasmático, devido a diminuição do valor de pH e alteração da pressão osmótica, resultam na libertação de iões de cálcio para o sarcoplasma (Delbarre-Ladrat et al., 2006), o

que vai proporcionar a ativação de uma série de enzimas que participam na degradação do músculo. Como já se referiu anteriormente, as proteases lisossomais como as catepsinas B, D e L são capazes de clivar proteínas miofibrilares (Chéret, Delbarre-Ladrat, Lamballerie-Anton & Verrez-Bagnis, 2007; Delbarre-Ladrat et al., 2006). A degradação das proteínas miofibrilares pela catepsina B depende do potencial redox do músculo. Em geral, os potenciais redox do músculo *postmortem* diminui de valores iniciais por volta de +100mV para -100 ou -200 mV. Para valores abaixo de -50mV a atividade das catepsinas B e L diminui significativamente (Jiang et al., 1994).

O peixe é caracterizado por possuir uma boa fonte de ácidos gordos polinsaturados que também podem ser oxidados por ação de enzimas oxidativas, originando odores e sabores por vezes desagradáveis. Após a morte do peixe, estes lípidos podem sofrer dois tipos de alterações: lipólise e oxidação. Os lípidos podem ser hidrolisados por enzimas lipolíticas (lípases) originando glicerol e ácidos gordos polinsaturados, que são facilmente oxidados por enzimas oxidativas. Estas enzimas podem ter origem endógena ou microbiológica (Al-Omirah, 1996; Hui, 2006; Zare, 2004).

## **B. Bacalhau**

*Bacalhau* é, na realidade, o nome comum para o género *Gadus*, pertencente a família *Gadidae*, que abrange cerca de 60 espécies. A espécie mais conhecida e com maior importância comercial é, sem dúvida, o bacalhau do atlântico, ou *Gadus morhua* (Figura 3). Também são conhecidas outras espécies, como a *Gadus macrocephalus* (bacalhau do Pacífico) e *Gadus ogac* (Bacalhau da Gronelândia). No entanto, a espécie *Gadus morhua* é considerada como o verdadeiro e genuíno bacalhau, sendo um dos peixes mais importantes economicamente da Europa do Norte (Helfman, Collette, Facey & Bowen, 2009; Lauritzen, 2004).



**Figura 3** – Representação do bacalhau do atlântico, *Gadus morhua* (adaptado de Helfman, 2009)

Em Portugal, o bacalhau é comercializado principalmente sob a forma de bacalhau salgado seco (Figura 4), sendo um produto altamente apreciado nos países mediterrânicos (Andrés, Rodríguez-Barona & Barat, 2005). Devido ao seu alto teor em sal, é necessário realizar a sua demolha antes de ser consumido, processo que é normalmente realizado em casa, mergulhando o bacalhau em água da torneira durante 24 a 48 horas sob refrigeração ou à temperatura ambiente (Muñoz-Guerrero, Gutiérrez, Vidal-Brotons, Barat, Gras & Alcaina, 2010).



**Figura 4** – Fotografia do bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*), na forma de salgado seco (adaptado de <http://www.mardanoruega.com/Bacalhau+da+Noruega> (2008))

O bacalhau é considerado um peixe magro, com 0,6% de lípidos. A composição geral do bacalhau varia de acordo com o sexo, idade, estação, temperatura da água, tipo e abundância de alimentos disponíveis (Lauritzsen, 2004). No bacalhau, o armazenamento da gordura é realizado no fígado, sendo este muitas vezes utilizado para fazer óleo de fígado de bacalhau, uma fonte importante de vitaminas A, D e E, e ácidos gordos polinsaturados. Destes ácidos gordos, têm especial atenção os ómega 3, como o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3), que existem nas quantidades aproximadas de 0,08 g e 0,15 g em 100g de músculo de peixe, respetivamente.



Os ácidos gordos polinsaturados têm propriedades que conferem um efeito protetor perante as doenças cardiovasculares, pela redução dos triglicerídeos, elevação do colesterol HDL e diminuição da pressão arterial (Belitz et al., 2009; Lauritzsen, 2004).

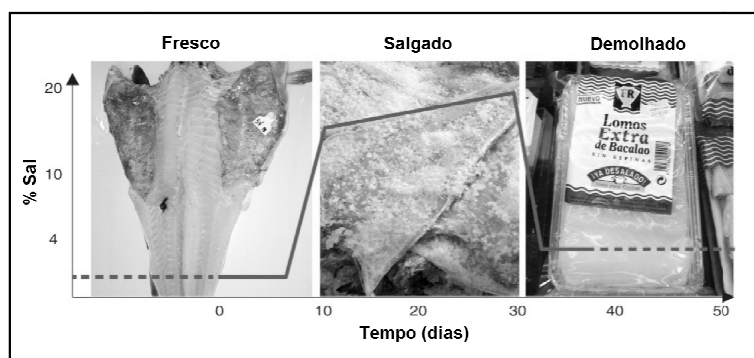
O músculo do bacalhau não é uniforme, mas contém proporções variadas dos três principais tecidos: fibras do músculo branco, fibras do músculo escuro e tecido conjuntivo, sendo o principal tecido e o mais abrangente as fibras do músculo branco (Lauritzsen, 2004).

## **1. O processamento do bacalhau**

Pensa-se que foram os antigos egípcios a conservar alimentos utilizando sal, mesmo antes dos chineses em 2000 AC. Desde então técnicas de preservação com sal foram difundidas por toda a Europa do sul. Assim, a salga e a secagem têm sido utilizadas desde há muito tempo como um método de preservação de peixe. Este tipo de bacalhau é encontrado em águas do norte, sendo posteriormente exportado sob a forma de bacalhau salgado para os países mediterrânicos, onde o bacalhau fresco não está disponível. Atualmente, o consumo anual estimado é de 15000 toneladas (Aas, Skjerdal, Stoknes & Bjorkevoll, 2010; Lorentzen, Olsen, Bjorkevoll, Mikkelsen & Skjerdal, 2010a).

Em Portugal, o bacalhau salgado seco continua a ter uma forte posição na gastronomia, representando um ícone da cultura e da identidade portuguesa. É altamente apreciado não só pelas suas características em sabor, textura e aroma, mas também devido a sua alta estabilidade de armazenamento e valor nutricional (Lauritzsen, 2004).

O bacalhau passa por três processos importantes antes de chegar às cozinhas dos consumidores: a salga, a secagem e a demolha (Figura 5). Ao longo destes três processos ocorrem diversas alterações sensoriais e organoléticas que conferem ao produto as características tão apreciadas pelos consumidores (Barat, Gallart-Jornet, Andrés, Akse, Carlehög & Skjerdal, 2006; Barat, Rodríguez-Barona, Castelló, Andrés & Fito, 2004c).



**Figura 5** – Variação da quantidade de sal durante o processo de salga e demolha do bacalhau (adaptado de Lorentzen, 2010)

É importante referir que as características do bacalhau como matéria-prima são importantes no produto final (salgado seco). Barat et al. (2006) estudaram a influência da frescura do bacalhau na salga, seca e demolha. Observaram que a frescura do peixe é importante no rendimento do processo de salga, o que talvez seja devido ao *rigor mortis* a que se encontra o peixe utilizado e as modificações que ocorrem no tecido muscular como consequência das enzimas proteolíticas, resultando em alterações dos coeficientes de transferência de massa para a difusão de sal e água.

### 1.1. A salga e a seca do bacalhau

A salga é o tratamento mais antigo na preservação de alimentos e consiste no transporte do cloreto de sódio para o interior do tecido muscular do bacalhau, enquanto a água flui para o exterior deste (Barat, Rodríguez-Barona, Andrés & Fito, 2003). A salga proporciona o aumento do prazo de validade dos alimentos por redução da atividade da água, como também por diminuição do valor de pH. Este processo pode ser longo (1-8 semanas), sendo o peixe virado algumas vezes para garantir que a salga é uniforme (Lauritzsen, 2004; Lorentzen et al., 2010a; Martínez-Alvarez & Gómez-Guillén, 2005).

Os métodos de salga aplicados diferem em relação ao mecanismo de transferência de massa e aos rendimentos de peso final (Thorarinsdottir, 2010). Entre os vários métodos de salga que existem atualmente (Tabela 3), salientam-se: a salga húmida (*pickesalting*), a salga seca (*dry salting* ou *kench curing*), a

injeção de salmoura (*injection salting*), a salga em salmoura (*brine salting*) e a salga em vácuo (*vacuum salting*).

**Tabela 3** – Principais métodos de salga utilizados no processamento do bacalhau (adaptado de Lauritzsen, 2004; Lorentzen et al., 2010a; Thorarinsdottir, 2010; Thorarinsdottir et al., 2004)

Tipo de salga	Características
Salga húmida ( <i>pickle salting</i> )	O peixe é sobreposto em camadas alternadas com sal. A entrada de sal é iniciada por extração do líquido do músculo do peixe e solubilização do sal. Uma salmoura saturada é formada na superfície dos filetes que extrai mais humidade do músculo. O sal difunde da superfície para o interior do músculo, enquanto a água migra na direção oposta (do interior para o exterior).
Salga seca ( <i>dry salting</i> ou <i>kench curing</i> )	É o método original utilizado no processamento de bacalhau salgado. É caracterizado pela distribuição do sal pela superfície do peixe, que tal como acontece na salga húmida, forma-se uma salmoura a superfície, mas neste caso é escoada da superfície. Durante o processo de salga as proteínas solúveis passam do músculo para a salmoura, pois o sal que difunde forma complexos com as proteínas.
Injeção de salmoura ( <i>injection salting</i> )	O músculo adquire uma concentração homogênea de sal num curto espaço de tempo comparado com os outros métodos. As injeções são realizadas utilizando uma máquina específica, que é programada antecipadamente com o número de injeções e a pressão a realizar. No entanto existe o risco de contaminação microbiológica e possível dano da estrutura muscular devido a pressão aplicada.
salga em salmoura ( <i>brine salting</i> )	É caracterizada pela imersão dos filetes dentro numa salmoura preparada com sal e água da torneira (numa concentração aproximada de 18-25% NaCl). A difusão do sal no músculo depende de vários fatores, como a concentração e composição da salmoura, a forma e espessura do produto, etc. A temperatura deve ser baixa (2-4°C) para minimizar o crescimento microbiológico.
Salga em vácuo ( <i>vacuum salting</i> )	Este tipo tem sido utilizado e tem resultado numa entrada de sal e água muito mais rápida do que a salga seca.

Os processos de salga de bacalhau têm sido melhorados significativamente, não só para preservar melhor o produto mas também para melhorar a quantidade do produto final (Martínez-Alvarez et al., 2005).

Em suma, durante o processo de salga o conteúdo em sal e água é alterado. O conteúdo em água é reduzido de aproximadamente 85 para 54% e o teor em sal aumenta de aproximadamente 1 para 20% (Lorentzen et al., 2010a).

### 1.1.1. Alterações bioquímicas após a salga e a seca

A salga do peixe provoca diversas alterações no músculo do bacalhau, desde a redução da atividade da água ( $a_w$ ) para valores entre 0,70 e 0,75, devendo-se referir que  $a_w$  tem um papel muito importante na preservação de

alimentos e no controlo do crescimento microbiológico (Hui, 2006); mas também provoca a redução dos valores de pH no músculo (Thorarinsdottir, 2010; Thorarinsdottir, Arason, Bogason & Kristbergsson, 2001).

O sal causa alterações nas proteínas, podendo provocar a sua desnaturação. Os iões sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) atuam como contra-íões positivos e negativos, respetivamente, afetando a conformação nativa das proteínas. A penetração do sal em todo o músculo faz com que a matriz miofibrilar aumente de volume, embora fique intacta devido ao sarcolema (membrana plasmática das células do tecido muscular) (Lauritzen, 2004; Thorarinsdottir, 2010).

As enzimas desempenham um papel importante no desenvolvimento do sabor e textura do bacalhau. O efeito do sal sobre a atividade enzimática depende da natureza das diferentes enzimas presentes no músculo e da concentração do sal envolvente. A variação na atividade enzimática do músculo do bacalhau salgado também pode estar relacionada com a capacidade de retenção de água, que dependem dos métodos de salga aplicados (Thorarinsdottir, 2010).

Apesar do baixo teor em gordura existente no bacalhau, os lípidos são sempre afetados, em certa medida, durante a salga, uma vez que o bacalhau possui essencialmente ácidos gordos polinsaturados que são muito suscetíveis a oxidação (Lauritzen, 2004). A presença de certos iões no sal utilizado na salga pode acelerar a oxidação lipídica, como é o caso do cobre. Iões de ferro, cobre, cálcio e magnésio provenientes do sal, do equipamento de processamento e/ou da água da torneira utilizada no processo pode acelerar, tanto a oxidação de lípidos, como também, a desnaturação de proteínas. O uso de antioxidantes adicionados durante o processo pode prevenir a oxidação lipídica do bacalhau salgado (Lauritzen, 2004; Thorarinsdottir, Arason, Geirsdottir, Bogason & Kristbergsson, 2002).

## 1.2. A demolha do bacalhau

Durante a demolha de bacalhau, ocorrem alterações na textura e nas propriedades histológicas, que resultam na diminuição da dureza do produto (Barat, Rodríguez-Barona, Andrés & Visquert, 2004b).

O bacalhau é submerso em água da torneira, que resulta na entrada de água (reidratação) e diminuição do conteúdo em sal (Thorarinsdottir et al., 2001). O conteúdo em água aumenta de aproximadamente 50% no bacalhau salgado para 85% no bacalhau demolhado. Enquanto, o teor em sal diminui de 20% no bacalhau salgado para 1-3% no bacalhau demolhado (Thorarinsdottir et al., 2002).

A deterioração específica por bactérias em bacalhau fresco é eliminada durante o processo de salga, mas no bacalhau demolhado ocorre o crescimento rápido de microrganismos, sendo a *Psychrobacter* spp um dos microrganismos mais relatados. Esta bactéria encontra-se na pele do bacalhau fresco e sobrevive durante 5 semanas durante o processo de salga nas embalagens tradicionais, podendo começar a crescer no bacalhau demolhado e durante o armazenamento (Aas et al., 2010). A *Listeria* também já foi encontrada no bacalhau demolhado mas não se sabe se é introduzida antes ou durante o processo de salga, sendo capaz de sobreviver ao processo de salga e crescer após a reidratação (Lorentzen et al., 2010a; Lorentzen, Ytterstad, Olsen & Skjerdal, 2010b).

A tendência crescente dos consumidores para exigirem os produtos *ready-to-use*, isto é, produtos prontos a utilizar, dificulta a comercialização de bacalhau salgado seco, devido a necessidade de demolhar o produto antes de se consumir (Barat et al., 2004c). Deste modo, é necessário proceder ao processo de demolha do bacalhau a nível industrial, havendo necessidade de controlar as variáveis envolventes. Existem vários estudos sobre o processo de salga e seca, mas muito pouco sobre a demolha de bacalhau.

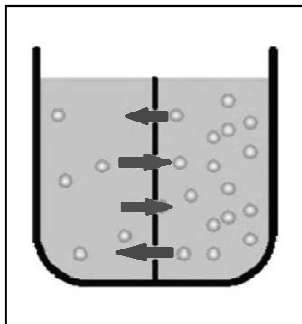
A descrição termodinâmica do sistema de demolha de bacalhau é também uma ferramenta útil para compreender as mudanças no bacalhau em todo o processo de demolha. Esta descrição inclui a definição dos componentes transferidos, a descrição das fases do sistema em que os processos de transferência de massa ocorrem e a definição das forças motrizes e os mecanismos de transferência de massa associados (Andrés et al., 2005).

Algumas variáveis já foram estudadas, observando-se que a agitação e a presença da pele não afetam o processo de demolha. No entanto, a cinética de transferência de massa é afetada pela estrutura do produto, quer pelo tamanho como pela forma. A utilização de pulsos de vácuo de 50 mbar de 15 minutos e de soluções salinas (à temperatura ambiente) também tem um efeito significativo no processo (Andrés et al., 2005). Já se observou que a troca da água de demolha não influencia na difusão do sal, sendo o processo sem troca de água o mais adequado e aconselhado, uma vez que tem vantagens como: maior simplicidade, menor investimento, maior rendimento do processo e menor volume de resíduos (Barat et al., 2004c).

#### **1.2.1. Cinética de transferência de massa durante a demolha**

Durante a demolha, ocorrem dois fenómenos: primeiro, ocorre a saída dos iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ; e segundo, a entrada de moléculas de água para dentro do músculo (Barat et al., 2004b). Portanto, pode-se afirmar que os principais componentes transferidos durante a demolha do bacalhau são o sal, a água e alguns compostos azotados, principalmente proteínas. Durante a demolha, a transferência de massa pode ser influenciada por diversos fatores, tais como a matéria-prima utilizada na salga, os métodos de salga e seca utilizados, a dureza do músculo e o próprio método de demolha (Andrés et al., 2005; Barat et al., 2006; Barat, Rodríguez-Barona, Andrés & Ibáñez, 2004a; Barat et al., 2004b).

O mecanismo que ocorre durante a demolha é a difusão (Figura 6), que corresponde ao movimento do soluto ( $\text{NaCl}$ ) da região com maior concentração para a região com menor concentração, e o movimento contrario para o solvente (água), isto é, de maior concentração para menor concentração.



**Figura 6** – Processo de difusão. Setas: da direita para esquerda corresponde à difusão de sal e da esquerda para direita à difusão de água (adaptado de Thorarinsdottir, 2010)

Em termos cinéticos, a difusão de água e sal seguem a 2ª lei de Fick, que é representada por uma equação diferencial de 2ª ordem (Equação 1).

**Equação 1** – Equação diferencial de 2ª ordem que representa a 2ª lei de Fick. Legenda:  $C$  – concentração,  $t$  – tempo,  $D_e$  – coeficiente de difusão efetiva,  $x$  - deslocamento

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_e \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

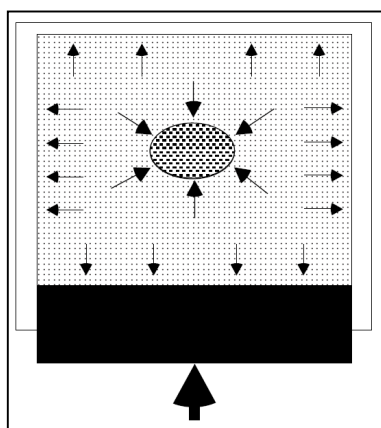
Esta equação caracteriza a velocidade de alteração da concentração de soluto ( $C$ ) em função do tempo ( $t$ ) e do deslocamento ( $x$ ). Estes dois fatores, tempo e deslocamento, são importantes na determinação dos coeficientes de difusão ( $D_e$ ) (Rastogi, Raghavarao, Niranjan & Knorr, 2002).

### **C. Tecnologia de alta pressão**

O tratamento de alta pressão é uma tecnologia não térmica de crescente interesse para o processamento e conservação de alimentos. Alguns produtos tratados por alta pressão já estão comercialmente disponíveis em alguns mercados, como no Japão, nos Estados Unidos e na Europa. Geralmente, os produtos são submetidos a alta pressão na gama de 100-1000 MPa (Cheret et al., 2005).

A técnica de alta pressão assenta em dois princípios chave: princípio de Le Chatelier e o princípio isostático. O princípio de Le Chatelier, enuncia neste

âmbito que uma alteração conformacional ou uma transição de fase ou mesmo uma reação química, que seja acompanhada por uma diminuição no volume vai ser favorecida pela pressão, e vice-versa. O princípio do tratamento isostático é apresentado na Figura 7. O produto alimentar é comprimido por uma pressão uniforme em todas as direções e depois retorna à sua forma original quando a pressão é liberada (Rahman, 2007).



**Figura 7** – O princípio de processamento isostático (adaptado de Rahman, 2007)

A alta pressão pode ser gerada por compressão direta ou indireta. Na compressão direta, o produto é diretamente pressurizado com um pistão, dentro do recipiente de pressurização, enquanto na compressão indireta, um amplificador de alta pressão bombeia o fluido através de um sistema de tubos, para que este chegue ao recipiente (Rahman, 2007).

A alta pressão inativa microrganismos prolongando o tempo de prateleira de alimentos, influencia biopolímeros e afeta atividades enzimáticas, enquanto fatores de qualidade, como nutrientes ou características funcionais, permanecem inalterados. Também afeta ligações químicas que induzem modificações na água, proteínas, polissacarídeos e lípidos. Nas proteínas, a alta pressão causa alterações nas interações moleculares hidrofóbicas e electrostáticas, com importantes consequências na estrutura secundária, terciária e quaternária das proteínas (Cheret et al., 2005; Zare, 2004). A aplicação de pressões moderadas pode acelerar a difusão de componentes nos alimentos (Villacís, Rastogi & Balasubramaniam, 2008).



## **1. Efeito da alta pressão nos lípidos**

A temperatura de fusão dos lípidos (triglicerídeos) aumenta de forma reversível, a temperaturas superiores a 10°C e a pressões de 100 MPa. Assim, os lípidos presentes no estado líquido à temperatura ambiente cristalizam sob pressão. A pressão favorece a formação de cristais mais densos e mais estáveis (aqueles com menor nível de energia e maior temperatura de fusão) (Cheftel & Culioli, 1997).

Pressões abaixo dos 400 MPa têm um pequeno efeito na oxidação lipídica do músculo do bacalhau, mas pressões superiores afetam a oxidação. Estes resultados sugerem que a oxidação acelerada pode ser devida a desnaturação de proteínas hémicas pela pressão, por libertação de iões que promovem a auto-oxidação dos lípidos (Angsupanich & Ledward, 1998).

## **2. Efeito da alta pressão nos microrganismos**

O efeito da alta pressão na viabilidade dos microrganismos é uma combinação de fatores que causam alterações na morfologia, constituição genética, reações bioquímicas, membranas celulares e nos esporos. As altas pressões alteram a permeabilidade da membrana celular resultando no distúrbio de mecanismos de transporte e provocando a morte celular. Estas alterações na morfologia da célula podem ser reversíveis a baixas pressões mas irreversíveis a altas pressões (Zare, 2004). A inativação de microrganismos também é devido às mudanças na estrutura e permeabilidade da membrana celular resultantes da cristalização dos fosfolípidos (Cheftel et al., 1997).

## **3. Efeito da alta pressão nas proteínas e enzimas**

A alta pressão desnatura as proteínas, que depende do tipo de proteínas, das condições de processamento e da pressão aplicada. As alterações provocadas são geralmente reversíveis no intervalo de pressões 100-300 MPa e irreversíveis para pressões superiores a 300 MPa. A desnaturação pode ocorrer

devido à quebra de ligações hidrofóbicas e de pares iónicos. A pressões altas, as proteínas oligoméricas tendem a dissociarem-se em subunidades tornando-se mais vulneráveis à proteólise. As proteínas monoméricas não apresentam mudanças na sua vulnerabilidade à proteólise com o aumento da pressão (Defaye, Ledward, MacDougall & Tester, 1995; Rahman, 2007; Rastogi, Raghavarao, Balasubramaniam, Niranjan & Knorr, 2007; Zare, 2004).

A alta pressão pode resultar na ativação ou inativação das enzimas dependendo no nível de pressão e condições. Normalmente, a pressões baixas (100 MPa), a atividade enzimática pode ser aumentada e a maiores pressões a atividade pode ser inativada. A aplicação de pressões baixas em alimentos pode danificar a membrana das células e libertar enzimas, proporcionando o contacto com o substrato (Zare, 2004). Na Tabela 4 estão representados alguns estudos sobre o efeito do tratamento de alta pressão em algumas enzimas presente em peixe.

Algumas enzimas encontram-se nos lisossomas, como é o caso da fosfatase ácida (40-60% encontra-se nas membranas dos lisossomas) e das catepsinas B, H, L e D. A alta pressão pode provocar o rompimento da membrana lisossomal e libertar enzimas (Takashi Ohmori, 1992). Na Tabela 4, observa-se que no músculo de robalo quando pressurizado ocorrem alterações na atividade de algumas enzimas. A fosfatase ácida pode ser usada como indicadora de rutura dos lisossomas. Quando o músculo é pressurizado observa-se um aumento da atividade da fosfatase ácida indicando libertação de enzimas dos lisossomas, pois quando o extrato sarcoplasmático é pressurizado (lisossomas não intactos) a atividade da enzima diminui, indicando inativação por alta pressão. O mesmo acontece com a catepsina B, H e L. No caso da catepsina D, ocorre um aumento da atividade aos 300 MPa, diminuindo acima desta pressão, e ocorrendo inativação aos 500 MPa no caso do extrato sarcoplasmático pressurizado, mas no músculo pressurizado, o valor da atividade é igualado ao valor inicial, sugerindo proteção pelo citoplasma (Cheret et al., 2005).

**Tabela 4** – Principais referências bibliográficas sobre o efeito do processamento de alta pressão em algumas enzimas em peixe

Amostra	Condições	Enzimas	Resultados mais relevantes	Referencia
Atum (músculo)	– 150-220 MPa – 15 e 30 min. – 20°C	– Atividade proteolítica geral	– Amostras tratadas a 220 MPa/30 minutos ocorre aumento da atividade ao fim de 22 dias de conservação; – Amostras não tratadas, ocorre aumento da atividade ao 14º dia de conservação.	(Zare, 2004)
Bacalhau (músculo)	– 100-800 MPa – 20 min. – 20°C	– Atividade proteolítica geral	– pH 6,6: a atividade diminui acima dos 200 MPa; – pH 3,3 e 9,0: a atividade aumenta até os 200 MPa e diminui em pressões superiores; – 800 MPa não inativa completamente a enzima.	(Angsupani ch et al., 1998)
Robalo (músculo e extrato sarcoplasmático)	– 50-500 MPa – 5 min. – 10°C	– Calpaínas – Catepsina D, B, L e H – Fosfatase ácida	– Calpaínas: diminui atividade a partir dos 100 MPa; – Catepsina D: aumenta atividade aos 300 MPa e diminui em pressões superiores; – Catepsina B, L e H: aumenta atividade (mais no extrato sarcoplasmático que no músculo); – Fosfatase ácida: aumenta atividade no músculo e diminui no extrato sarcoplasmático.	(Cheret et al., 2005)
Robalo (músculo e extrato sarcoplasmático)	– 0,1-500 MPa – 5 min. – 10°C	– Calpaínas	– Músculo: diminui atividade acima dos 100 MPa e perda total acima dos 350 MPa; – Extrato sarcoplasmático: diminui atividade acima dos 150 MPa e perda total acima dos 450 MPa.	(Chéret et al., 2007)
Salmão fumado (extrato sarcoplasmático)	– 0,1-300 MPa – 20 min. – 9°C	– Atividade proteolítica geral – Catepsina B e B+L – Calpaínas	– Catepsina B e B+L: atividade diminui até os 300 MPa; – Calpaínas: diminui atividade até os 100 MPa e depois mantem-se constante até os 300 MPa; diminuição da atividade de todas as enzimas com armazenamento até os 18 dias.	(Lakshman an, Patterson & Piggott, 2005)
“Bluefish” ( <i>P. saltatrix</i> ) e “sheephead” ( <i>S. pulcher</i> ) (extrato sarcoplasmático)	– 100-300 MPa, – 30 min. – Temp. ambiente	– Catepsina C – Colagenase – Quimiotripsina – Tripsina	– Diminuição da atividade em todas as enzimas.	(Ashie & Simpson, 1996)

#### 4. Efeito da alta pressão na difusão de componentes em alimentos

A tecnologia de alta pressão pode também ser usada como pré-tratamento para acelerar a difusão de componentes em alimentos, como é o caso de difusão

de solutos e de água. A aplicação da alta pressão entre 100-700 MPa durante a desidratação osmótica do ananas, observou-se um aumento da taxa de difusão de água e solutos (Rastogi & Niranjana, 1998). Também se observou que a aplicação desta tecnologia na infusão de sacarose em batatas aumentava a difusão do soluto até os 400 MPa, diminuindo posteriormente devido a gelatinização do amido (Sopananukul, Ledward & Niranjana, 2002). Pré-tratamentos com pressões moderadas podem ser usados para melhorar o processo de salga em peito de peru (Villacís et al., 2008). Também foi observado que a aplicação de alta pressão está associada a uma maior absorção de água em arroz glutinoso (Ahromrit, Ledward & Niranjana, 2006) e em grãos de milho (Muthukumarappan & Gunasekaran, 1992). Devido a estes estudos realizados relativamente ao efeito da alta pressão no aumento da transferência de massa em alimentos, a utilização desta tecnologia poderá ser interessante para acelerar o processo de demolha de bacalhau.

#### **D. enquadramento do trabalho e objetivos**

Este trabalho está dividido em duas partes: parte I – Efeito da alta pressão no processo de demolha de bacalhau; e parte II – Efeito da alta pressão na atividade enzimática da cavala.

##### ***Parte I - Efeito da alta pressão no processo de demolha de bacalhau***

Na primeira parte, partiu-se de um trabalho realizado anteriormente em que se estudou o processo de demolha de bacalhau à pressão atmosférica e sob pressão, com o objetivo de se tentar acelerar o processo de demolha. Testaram-se várias pressões (50-300 MPa), concluindo-se que os coeficientes de difusão aumentavam linearmente até os 200 MPa, sendo esta a melhor pressão a utilizar. O equilíbrio sob alta pressão é atingido mais rapidamente do que à pressão atmosférica (em 1 a 3 minutos), mas observa-se que apesar do equilíbrio ser atingido mais rapidamente, este ocorria para valores maiores de sal e menores de

água no bacalhau (Salvador, 2009). Deste modo, para tentar ultrapassar este problema, neste trabalho realizaram-se vários ensaios:

- Estudar o efeito do vácuo no processo de demolha tanto a pressão atmosférica como sob pressão (200 MPa), uma vez que todas as amostras tem de ser embaladas em vácuo antes de serem sujeitas a pressão, para verificar o efeito do vácuo no processo de demolha;
- Testar dois tratamentos sucessivos de 5 minutos a 200 MPa (com troca de água entre cada ciclo), utilizando embalamento com vácuo diferentes, a 55% (*Ensaio 1a*) e 85% (*Ensaio 1b*), de forma a observar se após se ter atingido o equilíbrio de difusão de sal e água entre o bacalhau e água de demolha a 200 MPa, ao se sujeitar novamente o bacalhau sob pressão em nova água de demolha se conseguia diminuir a quantidade de sal e aumentar a quantidade de água no bacalhau, relativamente ao valor inicial.
- Realizar dois ensaios (*Ensaio 2a* e *2b*) que consistiram na demolha de pedaços de bacalhau durante 30 minutos à pressão atmosférica, seguido de demolha a 200 MPa em nova água de demolha. Até os 30 minutos de demolha à pressão atmosférica, a difusão de sal e água é mais rápida, sendo mais lenta nos tempos seguintes, desta forma, este ensaio tem como objetivo acelerar a demolha partindo do instante em que a difusão se torna mais lenta. Utilizaram-se embalamentos a vácuo de 85%. No *Ensaio 2a* realizou-se de igual forma, mas diferindo no facto de após troca de água de demolha, deixou-se a repousar durante 60 minutos. Este tempo de repouso tem como objetivo provocar a difusão do sal no interior do pedaço de bacalhau (do centro para as superfícies), garantindo que o tempo de 60 minutos é suficiente para isto acontecer.

Nesta parte do trabalho também se estudou a variação da atividade enzimática, proteína solúvel e do pH ao longo do processo de demolha à pressão atmosférica e a duas temperaturas (4°C e 20°C).

## ***Parte II – Efeito da alta pressão na atividade enzimática da cavala***

Na segunda parte do trabalho estudou-se o efeito da utilização de tratamentos por alta pressão na atividade enzimática da cavala, tendo como

objetivo inativar enzimas que participem na degradação do músculo de peixe e reduzir a atividade destas mesmas enzimas ao longo do tempo de conservação quando congeladas.

As amostras foram tratadas com diferentes pressões/tempos de pressurização e estudaram-se as atividades de várias enzimas: catepsina B e D, fosfatase ácida e lipase. Também se estudou a atividade enzimática destas amostras ao longo do tempo de conservação quando congeladas (0, 1 e 3 meses de conservação).

Esta parte do trabalho insere-se num projeto de colaboração com um grupo de investigação em Espanha.

Assim, os objetivos deste trabalho são:

- Acelerar o processo de demolha de bacalhau através da utilização da alta pressão;
- Estudar a variação da atividade enzimática, da proteína solúvel e do pH ao longo do processo de demolha, à pressão atmosférica e a duas temperaturas (4 e 20°C);
- Estudar o efeito da alta pressão na atividade enzimática da cavala.



## **Capítulo II - Metodologia experimental**

### **Parte I. Efeito da alta pressão no processo de demolha do bacalhau.**

#### **A. Preparação das amostras de bacalhau**

A espécie de bacalhau do atlântico utilizada nas experiências foi *Gadus morhua*. O bacalhau salgado seco foi obtido localmente tendo sido armazenado sob refrigeração a 4°C.

As postas de bacalhau foram cortadas em pedaços apresentando uma configuração paralelepípedica de 2,25 x 1,5 x 1 cm e com um volume de 3,375 mL. Foram utilizados lombos, dos quais se retirou a pele, as espinhas e a superfície mais exterior. Todos os pedaços foram pesados antes dos ensaios, apresentando um peso entre 4,5 a 5 gramas.

#### **B. Ensaios de demolha de bacalhau**

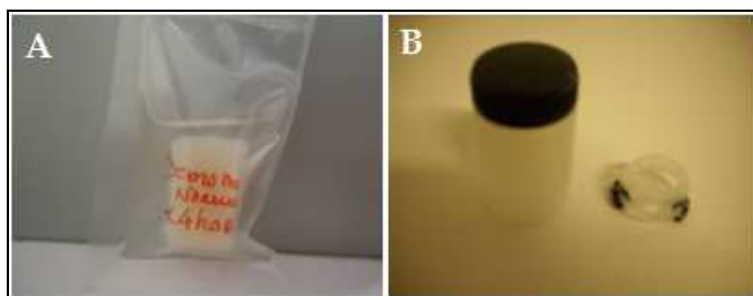
Em todos os ensaios para a determinação da variação da quantidade de NaCl e H<sub>2</sub>O ao longo da demolha, isto é, para determinar a cinética de demolha do bacalhau, os pedaços de bacalhau foram retirados da água de demolha, sendo esta diluída para 50 mL e conservada a 4°C. Os pedaços demolhados foram pesados e usados para quantificar a água e o sal.

##### **1. Demolha à pressão atmosférica (0,1 MPa)**

Os ensaios de demolha a pressão atmosférica foram realizados tentando sempre controlar todos os parâmetros envolvidos, desde temperatura, tempo, pressão e razão volume de água de demolha/volume de bacalhau (parâmetro  $\alpha$ ). A água utilizada foi água da torneira com o objetivo de reproduzir as condições convencionais de demolha tradicional.



Inicialmente, realizaram-se ensaios de demolha com um parâmetro  $\alpha=2$ . Para estes ensaios utilizaram-se sacos plásticos em polietileno (PE) onde se colocaram os pedaços de bacalhau, como se pode observar na Figura 8A. Nos ensaios de demolha para  $\alpha=9$ , utilizaram-se frascos também de PE (Figura 8B), com uma capacidade de 30 mL. Para segurar os pedaços de bacalhau no centro dos frascos, construíram-se uns pequenos suportes (Figura 8B). Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente, que rondava os 25°C.



**Figura 8** – Imagem fotográfica de: A – Sacos de plástico em polietileno (PE) utilizados na demolha para  $\alpha=2$ , B – frascos em PE utilizados na demolha para  $\alpha=9$

## **2. Demolha sob alta pressão (200 MPa)**

Os ensaios de demolha sob alta pressão foram realizados num aparelho Unipress Equipment (Polónia), Modelo U33 (Figura 9).



**Figura 9** - Imagem fotográfica do aparelho de alta pressão utilizado no trabalho experimental

Tal como foi realizado à pressão atmosférica, também foram realizados ensaios sob alta pressão utilizando parâmetros  $\alpha$  diferentes,  $\alpha=2$  e  $\alpha=9$ . Todos os ensaios de demolha sob alta pressão foram realizados à temperatura ambiente.

Para  $\alpha=2$ , as amostras foram embaladas utilizando 2 níveis de vácuo de 55 e 85%, enquanto para  $\alpha=9$  foram testados três níveis de vácuos diferentes (30, 55 e 85% de vácuo) com o objetivo de testar se este tem algum efeito na demolha de bacalhau. O embalamento em vácuo foi realizado num aparelho de vácuo (*Albipack Packaging Solutions*, Portugal).

Na demolha sob alta pressão, utilizou-se um valor de pressão de 200 MPa. Este valor foi escolhido, tal como já foi referido anteriormente nos objetivos deste trabalho, a partir de um estudo anterior em que se concluiu que os coeficientes de difusão aumentam linearmente até os 200 MPa, sendo esta a melhor pressão a utilizar na demolha sob alta pressão (Salvador, 2009).

### 3. Ensaio de otimização da demolha do bacalhau

Como já foi referido anteriormente nos objetivos deste trabalho, realizaram-se vários ensaios para tentar acelerar o processo de demolha do bacalhau salgado seco.

Primeiro, realizaram-se dois ensaios de ciclos sucessivos de 5 minutos (Figura 10), utilizando dois níveis de vácuo diferentes: 55% (*Ensaio 1a*) e 85% (*Ensaio 1b*). Em ambos os *Ensaio 1b*, foi realizado controlo em que não foi sujeito a alta pressão (200 MPa).

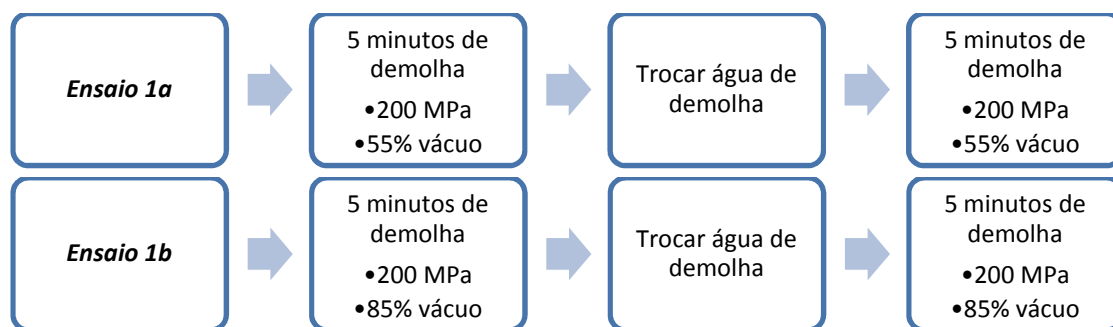


Figura 10 – Ensaio realizados para otimização do processo de demolha de bacalhau: *Ensaio 1a* e *1b*

De seguida realizaram-se mais dois ensaios (Figura 11), com o objetivo de após a amostra já ter sido sujeita a uma demolha a pressão atmosférica durante 30 minutos, em que a difusão é mais rápida, sujeitar a alta pressão (200 MPa). O *ensaio 2b* difere do *ensaio 2a* no facto de deixar-se em repouso durante 60 minutos após a troca de água de demolha e antes de se sujeitar a 200 MPa.

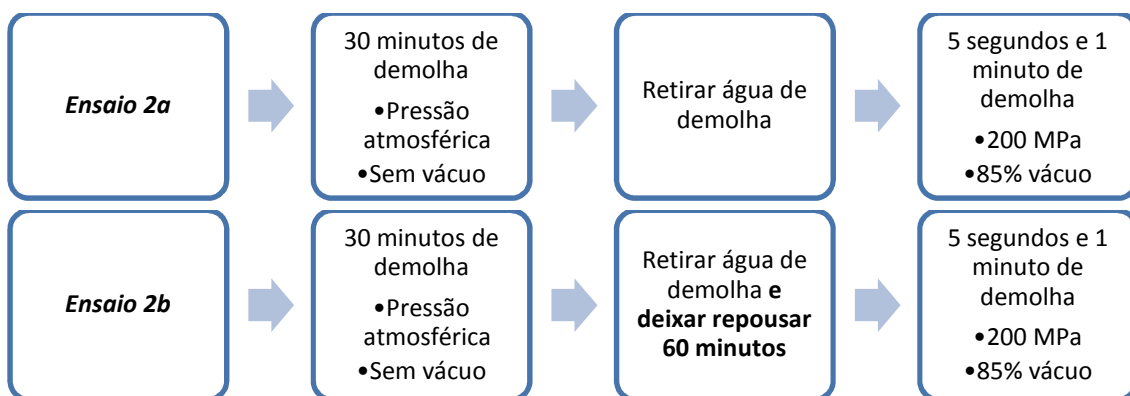


Figura 11 – Ensaios realizados para otimização do processo de demolha de bacalhau: Ensaios 2a e 2b

Para o caso do *Ensaio 2b* foram realizados dois controlos, *Controlo 1* e *Controlo 2*, que estão representados na Figura 12. Nos controlos, realizaram-se os mesmos procedimentos mas diferindo no valor de pressão utilizado (200 MPa -> Pressão atmosférica) no caso do *Controlo 1*, enquanto no *Controlo 2* difere também no valor de pressão e no nível de vácuo utilizado (85% -> Sem vácuo).

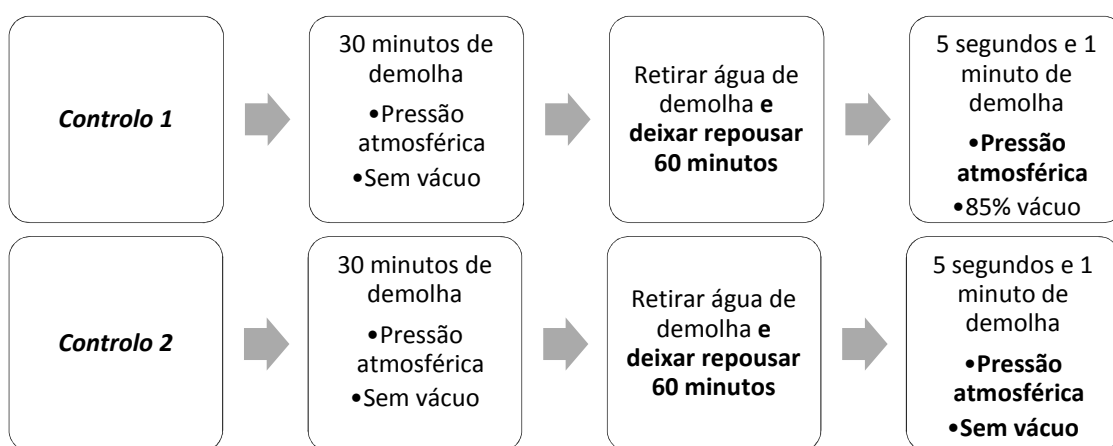


Figura 12 – Ensaios controlo realizados para otimizados do processo de demolha de bacalhau: Controlos 1 e 2 referentes ao Ensaio 2b

### **C. Determinação do conteúdo em H<sub>2</sub>O**

Para a determinação da quantidade de água nas amostras de bacalhau calculou-se a perda de peso durante a secagem das amostras. Os pedaços de bacalhau foram pesados e posteriormente colocados na estufa a  $105\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas, de seguida foram transferidos para um exsicador, onde permaneceram durante 5 minutos, aproximadamente, e então pesados. Posteriormente foram realizadas mais uma série de pesagens passado 2 horas para comprovar que o peso estabilizava. Os resultados foram expressos em mf/mi (relação massa final e massa inicial de água no bacalhau) e em  $\text{gH}_2\text{O/gSI}$  (sólidos insolúveis). Os ensaios foram realizados em duplicado.

### **D. Determinação do conteúdo em NaCl**

Os pedaços para a quantificação de sal foram triturados com um Ultraturrax® T25 a 9000 rpm durante 2 minutos, garantindo que toda a amostra é triturada. Posteriormente procedeu-se a filtração por vácuo realizando-se várias lavagens com água destilada. Após filtração, o filtrado foi colocado num balão de 100 mL, perfazendo-se o volume com água destilada. Na quantificação do NaCl presente nas amostras usaram-se dois métodos: método condutivimétrico e método de Volhard (químico). Os resultados foram expressos em mf/mi (relação massa final e massa inicial de sal no bacalhau) e em  $\text{gNaCl/gSI}$ .

#### **1. Método condutivimétrico**

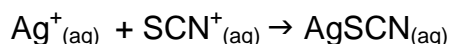
Este método baseia-se na medição da condutividade utilizando um condutímetro. Inicialmente, foram preparadas uma série de soluções padrões entre 0,5% e 20% de NaCl com água destilada, em que se realizou a medição de condutividade à temperatura ambiente, por construção de uma curva de calibração que relaciona a condutividade em função da % de NaCl. Esta curva de calibração foi utilizada para determinar a concentração de NaCl na amostra.

## 2. Método de Volhard

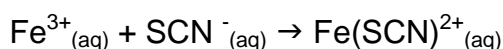
A quantificação de NaCl foi também realizada através do método de Volhard (Haouet, Altissimi, Framboas & Galarini, 2006). A 5 mL de amostra adicionou-se aproximadamente 5 mL de nitrato de prata 0.1M ( $\text{AgNO}_3$ ), formando-se um precipitado de cloreto de prata ( $\text{AgCl}$ ):



Os iões de  $\text{Ag}^+$  em excesso são titulados com tiocianato de potássio 0.1M ( $\text{KSCN}$ ) formando-se tiocianato de prata ( $\text{AgSCN}$ ):



Os iões  $\text{Cl}^-$  em solução são quantificados pela diferença entre a quantidade de  $\text{Ag}^+_{\text{total}}$  (adicionada na forma de nitrato de prata) e a quantidade de  $\text{Ag}^+_{\text{livre}}$  (que forma  $\text{AgSCN}$ ). O indicador alúmen férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) foi adicionado à solução a titular com o tiocianato de potássio. A solução permanece amarela enquanto existir  $\text{Ag}^+$  em solução. No ponto final da titulação, o ligeiro excesso de tiocianato reage com o  $\text{Fe}^{3+}$ , formando-se um complexo de cor laranja ( $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ ).



As titulações foram realizadas em duplicado. Para a realização das titulações utilizou-se uma bureta automática (microBU 2031 da Crison).

### E. Atividade enzimática, proteína solúvel e pH

Inicialmente, as amostras de bacalhau demolhado foram homogeneizadas em água destilada, utilizando um Ultraturrax® T25 a 9000 rpm, durante 2 minutos. Os homogeneizados resultantes foram centrifugados a 10000g (centrífuga 3K30, Sigma Laboratory Centrifuges, Germany), durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido foi recolhido para análise.

As medições de pH foram realizadas no sobrenadante obtido após a centrifugação, utilizando um medidor de pH (Micro-pH da Crison).

## 1. Quantificação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi realizada em demolhas sujeitas a duas temperaturas controladas, 20°C e 4°C. Foram estudadas as atividades de quatro enzimas: fosfatase ácida, catepsina B, catepsina D e lipase.

### 1.1. Atividade da fosfatase ácida

A atividade da fosfatase ácida foi determinada utilizando o método utilizado por Chéret et al. (2005) e Ohmori et al. (1992) com algumas alterações. A 250 µl de extrato enzimático foram adicionados 225 µl de solução tampão de acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5, contendo o substrato *p*-nitrofenilfosfato a 4 mM (Sigma-Aldrich-N22002) e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 1 mM. Após incubação durante 15 min a 37°C, a reação foi parada pela adição de 1000 µl de hidróxido de potássio 0,1 M. O *p*-nitrofenol formado foi quantificado a 400 nm num espectrofotómetro de UV/Visível (Elmer, modelo Lambda 25). O branco foi preparado de forma similar mas a reação foi parada logo após a adição do extrato enzimático. A atividade da fosfatase ácida foi calculada pela diferença entre a absorvância da amostra e do branco. Uma unidade (U) de atividade foi definida pelo aumento da absorvância por minuto, sendo expressa por gramas de peixe. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

### 1.2. Atividade da catepsina B

A atividade da catepsina B foi quantificada pelo método descrito por Lakshmanan et al. (2005), mas com algumas modificações. Adicionaram-se 100 µl de extrato enzimático a 100 µl de solução de substrato sendo posteriormente incubadas à 37°C durante 5 minutos. A solução de substrato foi preparada adicionando o substrato artificial *z*-Arg-Arg-MCA (arginil-arginil-4-metil-7-coumarilamina) a 0,0625 mM em solução tampão Bis-Tris 100 mM (pH 6,5), em EDTA a 20 mM, em ditiotreitól 4 mM, a 4°C. A reação foi parada pela adição de 1000 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 3% em tampão Bis-Tris 50 mM (pH

7,0). A reação da catepsina B liberta o produto AMC (7-amino-4-metilcoumarina) e a sua fluorescência foi medida a um comprimento de onda de emissão de 460 nm, depois de excitação a 360 nm (utilizou-se um espectrofluorímetro Fluoromax 3 - Horiba Jovin Yvon). O branco foi de igual modo, mas a reação foi parada logo após a adição de extrato enzimático. A atividade da catepsina B foi calculada pela diferença entre a fluorescência da amostra e do branco. Uma unidade (U) da atividade da catepsina B foi definida pelo aumento da fluorescência por minuto, sendo os resultados expressos em gramas de peixe. As análises foram realizadas em triplicado.

### **1.3. Atividade da catepsina D**

O ensaio para a atividade da catepsina D usado foi baseado no método usado por Buckow et al. (2010), mas com algumas alterações. A 200 µl de extrato enzimático foram adicionadas 600 µl de tampão citrato (0,2 M, pH 3,7) contendo hemoglobina bovina previamente desnaturada a 2% (Sigma-Aldrich-H2625). Após 3 horas de incubação a 37°C a reação foi terminada pela adição de 600 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, seguindo-se uma centrifugação à 13000 rpm durante 15 minutos. Os péptidos solúveis em TCA foram medidos a 280 nm num espectrofotómetro de UV/Visível (Elmer, modelo Lambda 25). O branco foi preparado de modo análogo, mas a reação foi parada logo após a adição do extrato enzimático. A atividade da catepsina D foi calculada através da diferença de absorvâncias entre a amostra e o branco. Uma unidade (U) enzimática foi definida pelo aumento da absorvância por minuto, sendo expresso em gramas de peixe. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicado.

### **1.4. Atividade da lipase**

A atividade da lipase foi determinada utilizando óleo experimental refinado de baixa acidez como substrato (Sigma-Aldrich-O1514), seguindo o protocolo sugerido pela Sigma. A mistura reacional consistiu em 1500 µl de substrato, 1750

μl de água destilada e 500 μl de solução tampão Tris HCl 200 mM (pH 7,7). Antes da adição do extrato enzimático, esta mistura foi previamente incubada a 37°C durante 2 minutos. De seguida adicionaram-se 1000 μl de extrato enzimático. A solução foi misturada vigorosamente e incubada a 37°C durante 24 horas. A reação foi parada adicionando 1500 μl de etanol 95% e transferida para um erlenmeyer. A seguir procedeu-se a titulação dos ácidos gordos livres formados, por titulação com uma solução de NaOH 25 mM, utilizando timolftaleína (0,9% w/v) como indicador. O branco foi preparado similarmente mas a reação foi parada após adição do extrato enzimático. A atividade da lipase foi calculada através da diferença entre a amostra e o branco. Uma unidade (U) enzimática foi definida pela quantidade de ácidos gordos livres formados por minuto, sendo expresso em gramas de peixe. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicado.

## **2. Quantificação da proteína solúvel**

O teor em proteína solúvel foi determinado utilizando o método de Biureto (Wilson & Walker, 2000). Inicialmente, construiu-se uma curva de calibração para se poder determinar a proteína solúvel presente nas amostras. Para isso, prepararam-se soluções padrão de proteína a partir de uma solução-mãe de albumina, com concentrações entre 1,5 e 5,0 mg/mL. Por fim, a 1 mL de padrões ou amostra adicionaram-se 5 mL de reagente Biureto, agitando-se de imediato. Deixou-se reagir, em repouso e no escuro, durante 30 minutos. Por fim, mediu-se a absorvância a 540 nm num espectrofotómetro de UV/Visível (Elmer, modelo Lambda 25). Tanto para os padrões como para as amostras os ensaios foram realizados em triplicado. O branco foi preparado de uma forma similar mas substituindo a amostra por água destilada. Os resultados obtidos foram apresentados em mg (proteína solúvel)/gSI.



### 3. Análise estatística

Os resultados obtidos na parte I e II deste trabalho foram analisados pela análise de variâncias (ANOVA). O método utilizado para as comparações múltiplas dos grupos foi o teste de Fisher (LSD) com um nível de significância de  $\alpha=0,05$ .

## Parte II. Efeito da alta pressão na atividade enzimática da cavala

### A. Preparação das amostras de peixe

A amostra de peixe utilizada foi a cavala (*Scomberomorus maculatus*), no âmbito do projeto de colaboração com a Universidade de Santiago de Compostela em Espanha. As amostras foram sujeitas a diferentes tratamentos de pressão e tempo de pressurização, enunciados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Diferentes tratamentos realizados nas amostras de cavala

Tratamentos	Pressão (MPa)	Tempo de pressurização (minutos)
1		Não processada (NP)*
2		Controlo**
3	150	2,5
4		5
5		Controlo**
6	300	2,5
7		5
8		Controlo**
9	450	2,5
10		5

\*Não processada (NP): amostras não sujeitas aos tratamentos de pressão;

\*\*Controlo: amostras sujeitas a 0 minutos sob pressão, sendo apenas pressurizadas e despressurizadas de imediato.

As amostras foram posteriormente congeladas (-20°C) e transportadas para os Laboratórios Tecnológicos da Universidade de Aveiro. Foram analisadas amostras pressurizadas correspondentes a três alturas diferentes, referentes ao:

- Mês 0 – momento a seguir ao processamento por alta pressão,
- Mês 1 – um mês de conservação das amostras congeladas,
- Mês 3 – três meses de conservação das amostras congeladas.

Cada tratamento era constituído por quatro peixes inteiros. Depois de descongelar, retirou-se o músculo branco e triturou-se uma picadora (Multiquick 5 MR 530 W) para a preparação dos extratos enzimáticos.

### **B. Preparação dos extratos enzimáticos**

Para a preparação dos extratos enzimáticos para cada tratamento, realizou-se a pesagem de 30 g de amostra triturada e, posteriormente, homogeneizou-se com 40 mL de água destilada fria utilizando um Ultraturrax (Janke & Kunkel/IKA T25) durante 2 minutos. De seguida, colocou-se a repousar a 4°C durante 30 minutos com agitação ocasional. Após o repouso, centrifugou-se o homogeneizado a 14600g durante 20 minutos, a 4°C (centrífuga 3K30, Sigma Laboratory Centrifuges, Germany). O sobrenadante foi filtrado (papel de filtro Whatman nº1) e armazenado a -20°C para posterior quantificação da atividade enzimática (Lakshmanan et al., 2005).

### **C. Quantificação da atividade enzimática**

A determinação da atividade enzimática foi realizada utilizando os métodos descritos anteriormente, na parte I deste trabalho, para as enzimas: fosfatase ácida, catepsina B, catepsina D e lipase.



## Capítulo III – Análise e discussão dos resultados

### Parte I. Efeito da alta pressão no processo de demolha do bacalhau

#### A. Ensaaios de demolha de bacalhau salgado seco

Em anexo (Anexo A) encontram-se os ensaios preliminares referentes a determinação do NaCl presente em amostras padrão (0-20%), utilizando-se os dois métodos: condutivimétrico e de Volhard. Observou-se que em ambos os métodos existem diferenças entre o valor obtido com o valor real do padrão, sendo as diferenças inferiores para o método de Volhard.

#### 1. Quantidade de NaCl e H<sub>2</sub>O no bacalhau salgado seco

A determinação do conteúdo em NaCl na amostra de bacalhau salgado seco também foi realizada pelos dois métodos, condutivimétrico e de Volhard. No entanto, como se pode observar na Tabela 6, existe uma grande diferença nos resultados obtidos na percentagem de NaCl presente para as mesmas amostras usando os dois métodos. Uma explicação para esta diferença nos resultados, pode ser devido as amostras mesmo depois de filtradas, observar-se a presença de algumas “fibras” (parte insolúvel do bacalhau) nas soluções preparadas, o que poderá interferir com os elétrodos do condutivímetro, influenciando assim os resultados obtidos (Salvador, 2009).

**Tabela 6** - Percentagem de NaCl na amostra de bacalhau salgado seco, obtida pelos dois métodos

NaCl (%)		Diferença entre os dois métodos (%)
Método condutivimétrico	Método de Volhard	
12,3 ± 0,7	17,2 ± 0,4	-39,8

Segundo a literatura, a percentagem de NaCl presente no bacalhau salgado seco está compreendida entre 15-20% (Barat et al., 2006), sendo o valor obtido pelo método de Volhard (Tabela 6) o que se encontra dentro do intervalo enunciado. Também se observa que os dois métodos apresentam uma grande

diferença, cerca de 40%. Assim, o método condutivimétrico foi utilizado para uma determinação qualitativa (presença/ausência) nos ensaios da demolha de bacalhau, para se obter uma estimativa da quantidade de NaCl presente na água de demolha. Enquanto o método de Volhard, foi utilizado como um método quantitativo na determinação do conteúdo em NaCl nas amostras de bacalhau.

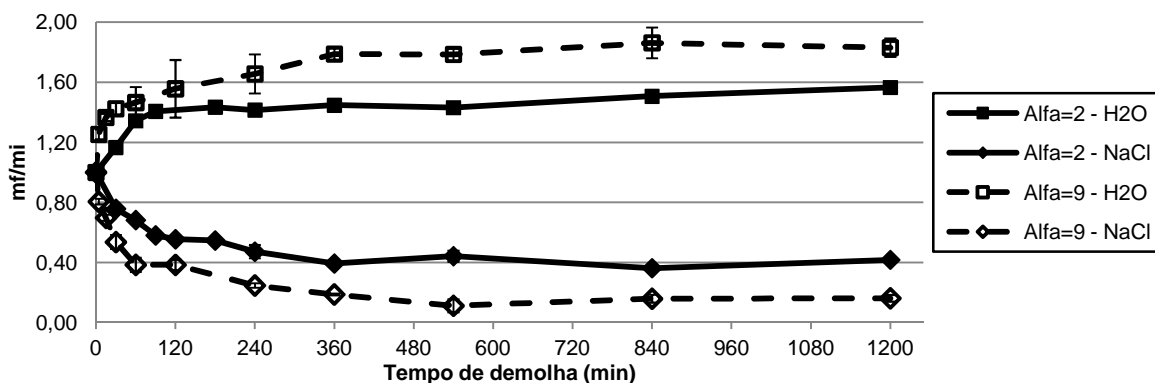
As amostras de bacalhau salgado seco continham, em teor de NaCl, entre 0,547 e 0,611 gNaCl/gSI, o que equivale a 17-18% de NaCl. Relativamente ao teor de água, a amostra continha entre 1,545 e 1,915 gH<sub>2</sub>O/gSI, o que equivale a 50-54% de água.

## **2. Demolha de bacalhau a pressão atmosférica (0,1 MPa)**

Relativamente aos ensaios de demolha de bacalhau a 0,1 MPa, foram realizadas demolhas utilizando duas razões volume de água de demolha/volume de bacalhau (parâmetros  $\alpha$ , 2 e 9), com o objetivo de observar se há influência na difusão de NaCl e H<sub>2</sub>O durante a demolha. Em ambos os casos o processo de demolha de bacalhau foi realizado durante 1200 minutos (20 horas).

### **2.1. Efeito do parâmetro $\alpha$ a pressão atmosférica (0.1 MPa)**

Como se observa na Figura 13 (a tabela correspondente encontra-se no Anexo B1), ao longo do processo de demolha ocorre difusão de água para o interior do bacalhau e difusão do NaCl no sentido contrário. Tanto para  $\alpha=2$  como para  $\alpha=9$  o comportamento é semelhante, mas a difusão é mais rápida utilizando  $\alpha=2$ , uma vez que se atinge o equilíbrio mais rápido. Também se observa que o valor final de NaCl e H<sub>2</sub>O no bacalhau nos dois casos é diferente, sendo menor o teor de NaCl e maior o teor de H<sub>2</sub>O na demolha com  $\alpha=9$ .



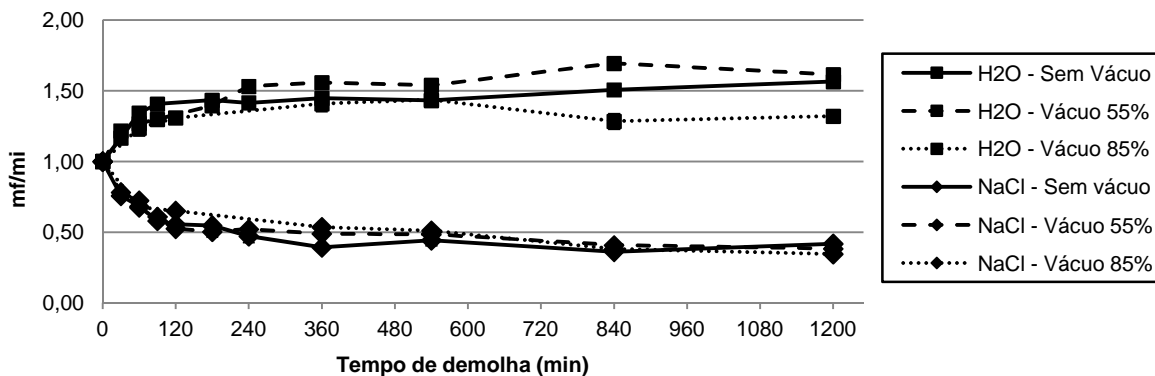
**Figura 13** – Variação da quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl de água e sal ao longo do processo de demolha de bacalhau, a temperatura ambiente e pressão atmosférica. Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl

A quantidade de H<sub>2</sub>O aumenta ao longo do tempo de demolha, partindo de uma percentagem de 54% e atingindo uma percentagem de, aproximadamente, 80% para  $\alpha=2$  e 90% para  $\alpha=9$ , no equilíbrio. A quantidade de NaCl decresce ao longo do tempo de demolha, diminuindo de uma percentagem de 17% e atingindo no equilíbrio uma percentagem de 7% para  $\alpha=2$  e 3% para  $\alpha=9$ . Como se pode observar, para  $\alpha=9$ , a quantidade de H<sub>2</sub>O é maior e a quantidade de NaCl é menor no equilíbrio. Isto era esperado, uma vez que o equilíbrio depende da quantidade de NaCl que se pode difundir e este do volume de água de demolha utilizado, sendo favorecido para volumes maiores de água de demolha para um igual volume de bacalhau. O mesmo acontece com a entrada de H<sub>2</sub>O, também seria esperado que um volume maior de H<sub>2</sub>O favorecesse a difusão desta, levando a um equilíbrio também diferente (Salvador, 2009).

## 2.2. Efeito do embalamento a vácuo no processo de demolha de bacalhau à 0.1 MPa

Para se verificar se o vácuo tinha algum efeito na demolha, várias amostras foram embaladas a dois níveis de vácuo (55% e 85%) e sujeitas a demolha. Com  $\alpha=2$ , na Figura 14 (a tabela correspondente encontra-se no Anexo B2) está representada a variação de H<sub>2</sub>O e NaCl ao longo de 1200 minutos (20 horas) de demolha. Observa-se que o vácuo aplicado não afeta o processo de demolha do bacalhau, uma vez que não se obtém diferenças nos valores obtidos tanto para a

difusão de NaCl e H<sub>2</sub>O ao longo do tempo de demolha para os diferentes níveis de vácuo.

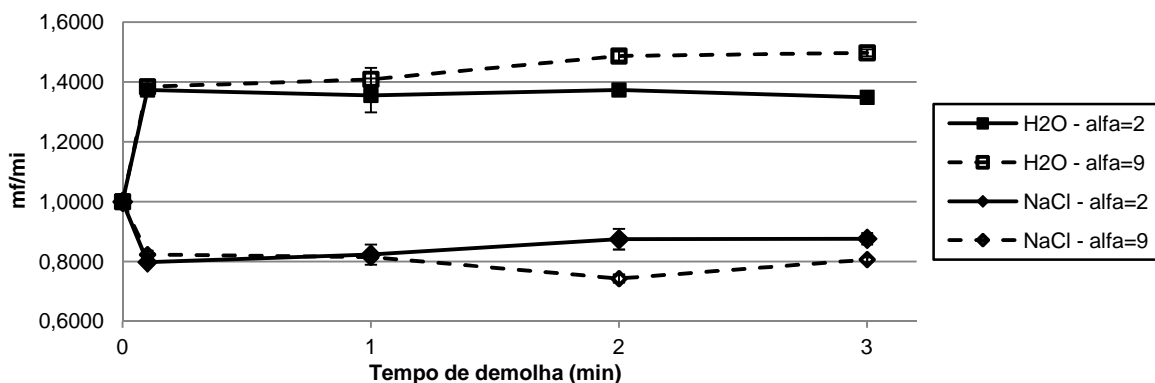


**Figura 14** - Variação da quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl ao longo do processo de demolha do bacalhau para diferentes níveis de vácuo (sem vácuo, 55% e 85%) para  $\alpha=2$  a pressão atmosférica. *Mf/mi*: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl

### 3. Demolha de bacalhau sob alta pressão (200 MPa)

#### 3.1. Efeito do parâmetro $\alpha$ no processo de demolha de bacalhau a 200 MPa

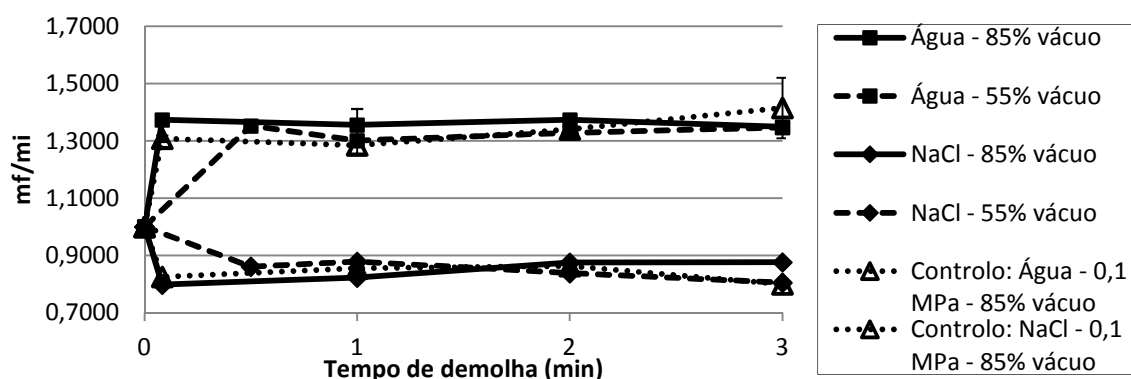
Amostras de bacalhau foram embaladas com vácuo de 85%, sendo posteriormente sujeitas a uma demolha sob alta pressão (200 MPa). Na Figura 15 (a tabela correspondente encontra-se no Anexo C1) está representada a variação de H<sub>2</sub>O e NaCl até 3 minutos de demolha para dois parâmetros  $\alpha$ : 2 e 9. Observa-se que inicialmente (até 1 minuto de demolha) o parâmetro  $\alpha$  não influencia a demolha de bacalhau sob alta pressão, no entanto para tempos superiores a 2 minutos, os valores obtidos entre as demolhas começam a distanciar-se, obtendo-se uma maior difusão de NaCl e H<sub>2</sub>O para  $\alpha=9$ . O mesmo comportamento já se tinha obtido para a demolha à pressão atmosférica.



**Figura 15** - Variação da quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl ao longo do processo de demolha, utilizando 85% de vácuo, a 200 MPa. Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl

### 3.2. Efeito do embalamento a vácuo no processo de demolha de bacalhau a 200 MPa

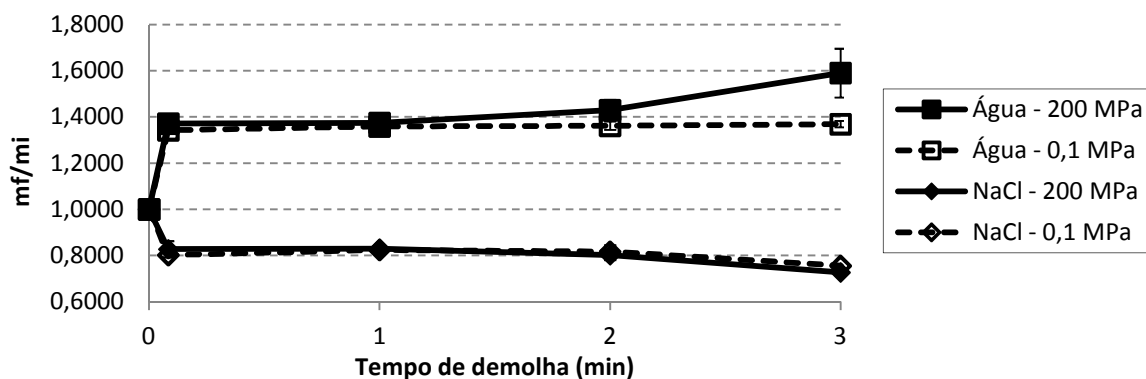
Sob alta pressão (200 MPa), para  $\alpha=2$ , realizaram-se estudos da difusão de NaCl e H<sub>2</sub>O ao longo do tempo de demolha utilizando dois níveis de vácuo diferentes, 55% e 85%. Assim, como se pode observar na Figura 16 (a tabela correspondente encontra-se no Anexo C1), observa-se que o comportamento em ambas as situações é muito semelhante, o que confirma que também sob pressão o vácuo não influencia a difusão de NaCl e H<sub>2</sub>O. Para um nível de vácuo de 85%, realizou-se um ensaio controlo a pressão atmosférica, em que também não se observa diferenças na difusão de NaCl e H<sub>2</sub>O.



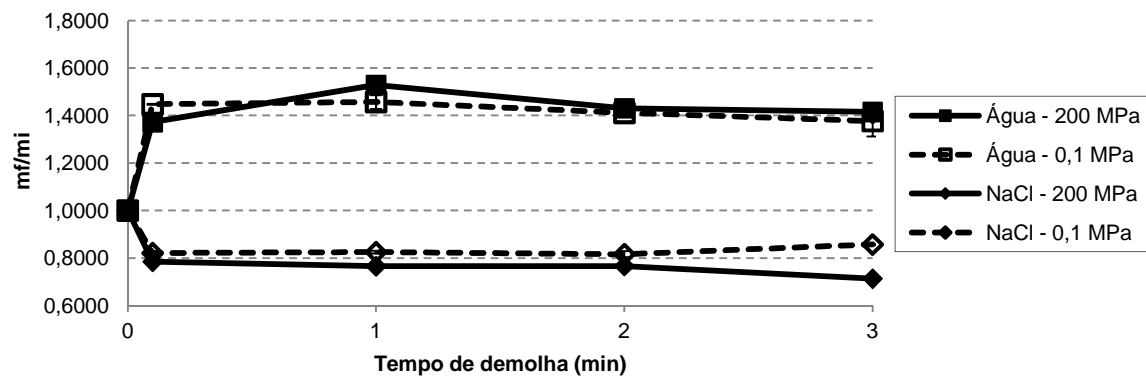
**Figura 16** - Variação da quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl ao longo do processo de demolha, utilizando dois níveis de vácuo, 55 e 85%, para  $\alpha=2$ , sob alta pressão



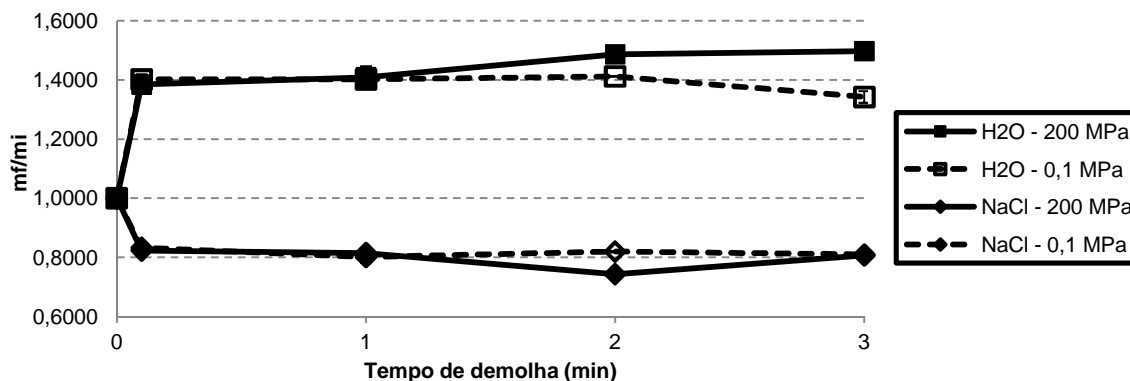
Nos gráficos representados na Figura 17, Figura 18 e Figura 19 (as tabelas correspondente encontra-se no Anexo C2) estão representados os valores obtidos para  $\alpha=9$ . Neste caso as amostras de bacalhau foram embaladas em três níveis de vácuo diferentes: 30, 55 e 85%. Observa-se que utilizando os diferentes níveis de vácuo sob alta pressão não ocorre alteração na difusão de  $H_2O$  e NaCl entre o pedaço de bacalhau e a água de demolha.



**Figura 17** – Variação da quantidade de  $H_2O$  e NaCl em mf/mi (relação massa final e massa inicial de  $H_2O$  e NaCl), ao longo da demolha a 200 MPa até os 3 minutos, para um  $\alpha=9$  e para um nível de vácuo de 30%



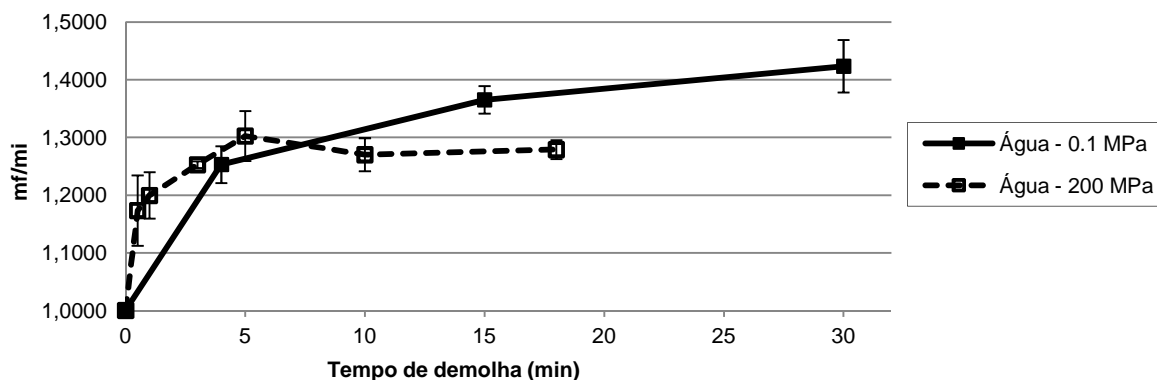
**Figura 18** - Variação da quantidade de  $H_2O$  e NaCl em mf/mi (relação massa final e massa inicial de  $H_2O$  e NaCl), ao longo da demolha a 200 MPa até os 3 minutos, para um  $\alpha=9$  e para um nível de vácuo de 55%



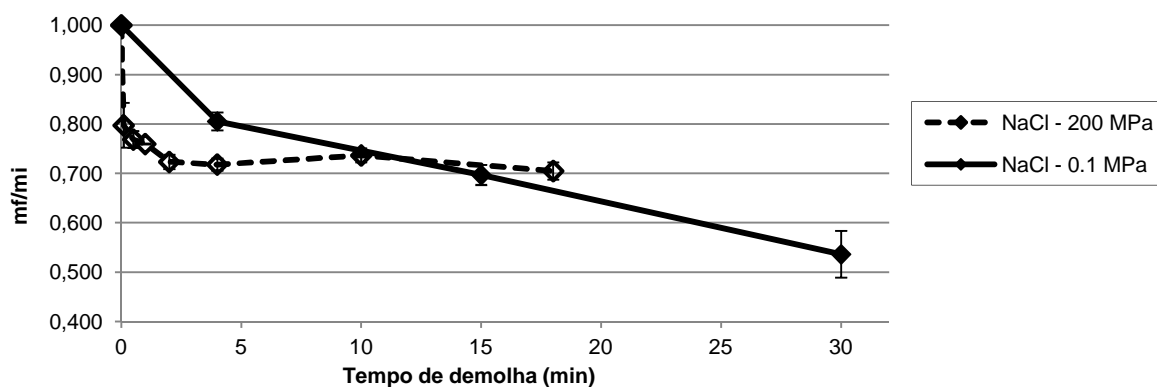
**Figura 19** - Variação da quantidade de  $H_2O$  e  $NaCl$  em  $mf/mi$  (relação massa final e massa inicial de  $H_2O$  e  $NaCl$ ), ao longo da demolha a 200 MPa até os 3 minutos, para um  $\alpha=9$  e para um nível de vácuo de 85%

#### 4. Comparação entre a demolha de bacalhau a 0,1 e 200 MPa

Como se observou anteriormente, o embalamento a vácuo não tem influência na difusão de sal e água no processo de demolha de bacalhau, tanto a 0,1 MPa (pressão atmosférica) como a 200 MPa (sob alta pressão), mas o parâmetro  $\alpha$  utilizado no processo de demolha já tem efeito, isto é, quanto maior for o volume de água de demolha utilizado em relação ao volume da amostra, maior e mais rápida é a difusão de sal e água no processo. Desta forma, comparando os dois processos a pressões diferentes (0,1 MPa e 200 MPa) para um valor  $\alpha$  igual ( $\alpha=9$ ), observa-se que se atinge um equilíbrio mais rápido nas experiências sob pressão (Figura 20 e Figura 21). As experiências sob alta pressão foram realizadas até os 18 minutos, uma vez que os valores já não variavam, pois o processo de difusão já se encontrava em equilíbrio. Os valores utilizados correspondem aos valores apresentados na Figura 13 e na Figura 15 para  $\alpha=9$ .



**Figura 20** – Quantidade de água ao longo do processo de demolha para  $\alpha=9$  a 200 MPa e 0,1 MPa (pressão atmosférica). O ensaio sob alta pressão foi anteriormente embalado a 85% de vácuo. Mf/mi (relação massa final e massa inicial de  $H_2O$  e NaCl)



**Figura 21** - Quantidade de sal ao longo do processo de demolha para  $\alpha=9$  a 200 MPa e 0,1 MPa (pressão atmosférica). O ensaio sob alta pressão foi anteriormente embalado a 85% de vácuo. Mf/mi: relação massa final e massa inicial de  $H_2O$  e NaCl

Na demolha sob alta pressão, isto é, a 200 MPa, a água passa de um valor inicial de 50% para 55% no equilíbrio. O sal passa de um valor inicial de 17% para um valor no equilíbrio de 11%. Como se observa, não se consegue obter os mesmos valores finais que para o caso da demolha à pressão atmosférica (90% de água e 3% de sal), mas consegue-se obter uma redução de sal de 35% só com 2 minutos de demolha à 200 MPa, o que equivale a 15 minutos de demolha à 0,1 MPa.

## 5. Ensaio de otimização da demolha do bacalhau

Um inconveniente na demolha de bacalhau a 200 MPa é não se conseguir obter o valor final de água e sal igual ao da demolha a 0,1 MPa, embora a difusão

seja mais rápida. Assim, foram realizados uma série de ensaios para se tentar encontrar formas de ultrapassar este problema.

Desta forma, pensou-se em realizar ciclos sucessivos de 5 minutos de demolha sob pressão (200 MPa), pois com este tempo já se verificava o equilíbrio, testando dois níveis de vácuo, 55 e 85%. O primeiro ensaio foi o *Ensaio 1a*, que consistia numa demolha de 5 minutos a 200 MPa, seguida de troca de água de demolha e no fim mais uma demolha de 5 minutos a 200 MPa, com embalamento em vácuo de 55%. Como se pode observar na Tabela 7 (os resultados expressos em percentagem e gramas SI encontram-se no Anexo C3), este ensaio não teve efeito na difusão de água e sal, uma vez que os valores médios entre 5 minutos + 5 minutos e 10 minutos de demolha sob alta pressão, não são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7** – Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha com  $\alpha=9$ : *Ensaio 1a*. Resultados expressos em mf/mi (relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl)

Ensaio de demolha (55% vácuo/200MPa)	H <sub>2</sub> O	NaCl
Valor inicial (bacalhau salgado seco)	1,0000 <sup>c</sup>	1,000 <sup>a</sup>
5 minutos	1,2341±0,0073 <sup>b</sup>	0,763±0,002 <sup>b</sup>
5 minutos + 5 minutos	1,3428±0,0421 <sup>a</sup>	0,631±0,008 <sup>c</sup>
10 minutos	1,2793±0,0440 <sup>ab</sup>	0,636±0,002 <sup>c</sup>

Colunas: letras (a, b, c) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

De seguida realizou-se um segundo ensaio, o *Ensaio 1b*, que difere do anterior no nível de vácuo, realizando-se desta vez a 85%. Nos resultados apresentados na Tabela 8 (os resultados expressos em percentagem e gramas SI encontram-se no Anexo C3) observa-se que a difusão de água e sal é superior no ensaio 5 minutos + 5 minutos sob pressão (200 MPa) do que durante os 10 minutos de demolha a 200 MPa, sendo significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). No entanto, no ensaio controlo, em que foi realizado à pressão atmosférica (0,1 MPa), o valor não é significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) ao do ensaio 5 minutos + 5 minutos realizado a 200 MPa.

**Tabela 8** - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha com  $\alpha=9$ : Ensaio 1b. Resultados expressos em mf/mi (relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl)

Ensaio de demolha (85% vácuo/200MPa)	H <sub>2</sub> O	NaCl
Valor inicial (bacalhau salgado seco)	1,0000 <sup>c</sup>	1,000 <sup>a</sup>
5 minutos	1,2880±0,0495 <sup>b</sup>	0,749±0,002 <sup>o</sup>
5 minutos + 5 minutos	1,4153±0,0600 <sup>a</sup>	0,658±0,024 <sup>c</sup>
10 minutos	1,2701±0,0288 <sup>b</sup>	0,736±0,014 <sup>b</sup>
Controlo		
5 minutos + 5 minutos (85% vácuo/0.1MPa)	1,3740±0,0537 <sup>ab</sup>	0,621±0,002 <sup>d</sup>

Colunas: letras (a, b, c, d) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ).

Posteriormente, como já foi referido anteriormente, pensou-se em realizar um segundo ensaio em que após sujeitar o bacalhau a um processo de demolha à pressão atmosférica durante os primeiros 30 minutos, em que a difusão de sal e água é mais rápida, sujeitar o mesmo pedaço a uma demolha sob pressão (200 MPa) para verificar se era possível acelerar a difusão do sal e água. Assim, o *Ensaio 2a* consistiu num ensaio de demolha à pressão atmosférica durante 30 minutos e de seguida sujeitou-se durante vários minutos a 200 MPa. Na Tabela 9 pode observar-se que tanto para a água como para o sal, a difusão não é afetada pela pressão, uma vez que não são estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ), obtendo-se o mesmo resultado para as amostras sujeitas a pressão de 200 MPa como para as amostras controlo sujeitas ao mesmo tempo mas a 0,1 MPa.

**Tabela 9** - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha: Ensaio 2a. Resultados expressos em mf/mi (relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl)

ENSAIOS DE DEMOLHA		H <sub>2</sub> O	NaCl
Valor inicial (bacalhau salgado seco)		1,0000 <sup>c</sup>	1,000 <sup>a</sup>
30 minutos		1.5547±0.0407 <sup>b</sup>	0.621±0.007 <sup>b</sup>
2º tempo de demolha		200 MPa	Controlo: 0.1 MPa
	5 seg	1,6350±0,0468 <sup>ax</sup>	1,6626±0,0730 <sup>ax</sup>
	1 min	1,6653±0,0456 <sup>ax</sup>	1,5868±0,1243 <sup>ax</sup>
	3 min	1,6255±0,0281 <sup>ax</sup>	1,6560±0,1136 <sup>ax</sup>
	5 min	1,6921±0,0641 <sup>ax</sup>	1,6902±0,0905 <sup>ax</sup>
	10 min	1,6561±0,0177 <sup>ax</sup>	1,5964±0,0885 <sup>ax</sup>
		200 MPa	Controlo: 0.1 MPa
		0,551±0,042 <sup>cx</sup>	0,532±0,049 <sup>cx</sup>
		0,540±0,048 <sup>cx</sup>	0,561±0,001 <sup>cx</sup>
		0,545±0,006 <sup>cx</sup>	0,584±0,002 <sup>cx</sup>
		0,547±0,007 <sup>cx</sup>	0,542±0,001 <sup>cx</sup>
		0,535±0,003 <sup>cx</sup>	0,537±0,004 <sup>cx</sup>

Colunas: letras (a, b, c) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ).

Linhas: a letra x significa que não são estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ).

De seguida realizou-se um *Ensaio 2b* que distinguira do anterior no facto que ao fim dos 30 minutos de demolha à pressão atmosférica deixava-se em

repouso durante 60 minutos, sem água de demolha. Pensou-se que provavelmente o sal não difundia para a água de demolha devido à saída muito rápida do sal da superfície mais exterior da amostra de bacalhau na demolha sob pressão. Desta forma, pensou-se em deixar o pedaço a repousar durante 60 minutos sem água de demolha para garantir a homogeneização da concentração de sal no interior, antes de um novo ciclo de demolha como também de forma a garantir que é tempo suficiente para ocorrer. Neste caso só se realizaram dois pontos sob pressão (5 segundos e 1 minuto). Na Tabela 10 (os resultados expressos em percentagem e gramas SI encontram-se no Anexo C3) observa-se que ocorre um aumento do conteúdo de H<sub>2</sub>O e diminuição do conteúdo de NaCl no interior do pedaço de bacalhau comparativamente com os dois controlos, controlo 1 e 2, sendo significativamente diferentes ( $p<0,05$ ). Assim conseguiu-se uma redução da quantidade de sal no interior do bacalhau de aproximadamente 65% (redução de uma percentagem de 17% para uma percentagem final de 6% em NaCl), o que equivale a 60-120 minutos (1 a 2 horas) na demolha à pressão atmosférica. Importa em estudos futuros, verificar se o tempo de repouso de 60 minutos pode ser reduzido.

**Tabela 10** - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha com  $\alpha=9$ : Ensaio 2b. Resultados expressos em mf/mi (relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl)

Ensaio de demolha		H <sub>2</sub> O	NaCl
Valor inicial (bacalhau salgado seco)		1.0000 <sup>e</sup>	1.000 <sup>a</sup>
30 minutos		1.5547±0.0407 <sup>d</sup>	0.621±0.007 <sup>b</sup>
+ 5 segundos	85% vácuo - 200 MPa	1.6625±0.0158 <sup>c</sup>	0.480±0.008 <sup>de</sup>
	Controlo: 85% vácuo - 0.1 MPa	1.6933±0.0384 <sup>c</sup>	0.461±0.004 <sup>e</sup>
+ 1 minuto	85% vácuo - 200 MPa	<b>1.9316±0.0294<sup>a</sup></b>	<b>0.439±0.013<sup>f</sup></b>
	Controlo 1: 85% vácuo - 0.1 MPa	1.8151±0.0216 <sup>b</sup>	0.485±0.017 <sup>d</sup>
	Controlo 2: Sem vácuo - 0.1 MPa	1.6269±0.0287 <sup>c</sup>	0.514±0.003 <sup>c</sup>

Colunas: letras (a, b, c, d, e, f) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ).

## 6. Variação da proteína solúvel, pH e atividade enzimática ao longo do processo de demolha de bacalhau

Foram realizadas duas demolhas de bacalhau a duas temperaturas controladas, 4 e 20°C (os resultados da variação de sal e água estão no Anexo

D1). Nos resultados pode verificar-se que a difusão de sal e água não é influenciada pela temperatura. É ainda importante notar que as quantidades no equilíbrio são semelhantes em ambas as condições de demolha, tanto para os valores do teor em água como para os valores do teor em sal. A partir destes resultados, conclui-se que, em termos de teor em água e em sal no produto final, é indiferente realizar a demolha a 20°C ou a 4°C.

### 6.1. Variação da proteína solúvel no processo de demolha de bacalhau

Na Tabela 11 e na Figura 22 (no Anexo D2 encontra-se a curva de calibração utilizada para o cálculo da concentração de proteína solúvel) está representada a quantidade de proteína solúvel (mg proteína solúvel/gSI) em função do tempo de demolha de bacalhau às duas temperaturas diferentes, 4 e 20°C. A concentração inicial de proteína solúvel na amostra, 138,8±10,4 mg proteína solúvel/gSI, vai decrescendo ao longo da demolha, atingindo o valor final de 58,7±0,5 mg proteína solúvel/gSI no caso da demolha a 20°C e de 49,22±3,2 mg proteína solúvel/gSI no caso da demolha a 4°C. Observa-se que a partir dos 240 minutos os valores não são estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ) entre as duas temperaturas, exceto aos 960 minutos em que volta a ser superior o valor obtido na demolha a 20°C.

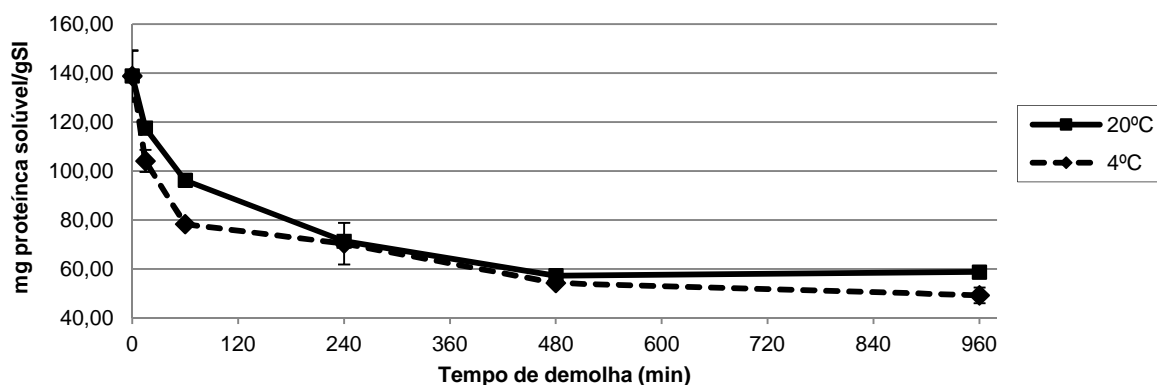
**Tabela 11** – Valores obtidos para a quantidade de proteína solúvel (mg proteína solúvel/gSI) no músculo de bacalhau ao longo do processo de demolha a 4 e 20°C

Tempo (min)	20°C	4°C
0*	138,8±10,4 <sup>a</sup>	
15	117,5±1,5 <sup>bx</sup>	104,1±4,5 <sup>by</sup>
60	96,2±0,5 <sup>cx</sup>	78,3±0,8 <sup>cy</sup>
240	71,3±0,5 <sup>dx</sup>	70,3±8,5 <sup>cx</sup>
480	57,2±1,0 <sup>ex</sup>	54,2±0,5 <sup>dx</sup>
960	58,7±0,5 <sup>ex</sup>	49,2±3,2 <sup>dy</sup>

Colunas: letras (a, b, c, d, e) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ );

Linhas: letras (x, y) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ );

\*Bacalhau salgado seco.



**Figura 22** – Variação da proteína solúvel (mg proteína solúvel/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha a 4 e 20°C

O músculo do peixe contém uma grande concentração de proteínas com fortes propriedades de solubilização em soluções aquosas e salinas: proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares (Hultmann, 2004). A perda de proteínas durante o processo pode dever-se à perda das próprias proteínas solúveis para a água de demolha. Entretanto, o próprio processo de salga que ocorre anteriormente afeta a estabilidade conformacional das proteínas do músculo provocando desnaturação das proteínas miofibrilares (Thorarinsdottir et al., 2002). Estas alterações também podem induzir a solubilização das proteínas na água de demolha (Barat et al., 2004b). A percentagem de proteína solúvel perdida pelo músculo do bacalhau foi calculada a partir dos valores iniciais (0 minutos) e finais (960 minutos) obtidos para a demolha à 20°C:

$$\text{Percentagem de proteína perdida} = \frac{138.8 - 58.7}{138.8} * 100 = 54.7\%$$

Assim realizou-se um estudo para confirmar se, de facto, a proteína perdida pelo músculo de bacalhau teria sido transferida para a água de demolha. Quantificou-se a proteína solúvel presente na água de demolha após 60 e 960 minutos de demolha (Tabela 12).

**Tabela 12** – Proteína solúvel na água de demolha (20°C)

Tempo de demolha (min)	Proteína solúvel (mg/ml)	
	Média	Desvio padrão
60	N.q.	
960	3,391	0,123

N.q. - Não quantificável.



Após 60 minutos de demolha, a concentração de proteína solúvel na água era demasiado baixa para ser quantificada através do método de Biureto, Após 960 minutos (final da demolha) a concentração de proteína solúvel na água de demolha era já quantificável e apresentava um valor de  $3,391 \pm 0,123$  mg/mL. Calcularam-se, então, os valores correspondentes às variações de massa de proteína solúvel verificadas no bacalhau e na água de demolha (Anexo D3), com o objetivo de comparar os resultados obtidos nas duas situações. Verificou-se que a massa de proteína perdida pelo bacalhau correspondia a 121,7 mg, enquanto a massa de proteína presente na água de demolha era de 101,7 mg. Os valores obtidos encontram-se relativamente próximos, o que indica que, durante a demolha, a proteína solúvel foi transferida do bacalhau para a água de demolha. No entanto, os valores diferem entre si em 20 mg de proteína solúvel, o que pode indicar a ocorrência de desnaturação proteica ou a existência de erros experimentais (provocados, por exemplo, por perdas ao longo da análise).

## 6.2. Variação do pH no processo de demolha de bacalhau

Na Tabela 13 e na Figura 23 está representada a variação de pH no músculo de bacalhau ao longo do processo de demolha.

**Tabela 13** - Variação do pH no processo de demolha de bacalhau

Tempo de demolha (min)	4°C	20°C
0*	$6,06 \pm 0,06^b$	$6,06 \pm 0,06^c$
15	$6,06 \pm 0,01^b$	$6,31 \pm 0,01^b$
60	$6,10 \pm 0,04^b$	$6,38 \pm 0,02^b$
240	$6,13 \pm 0,06^b$	$6,53 \pm 0,04^a$
480	$6,11 \pm 0,01^b$	$6,59 \pm 0,02^a$
960	$6,25 \pm 0,06^a$	$6,54 \pm 0,01^a$

Colunas: letras (a, b, c) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ );

\*Bacalhau salgado seco.

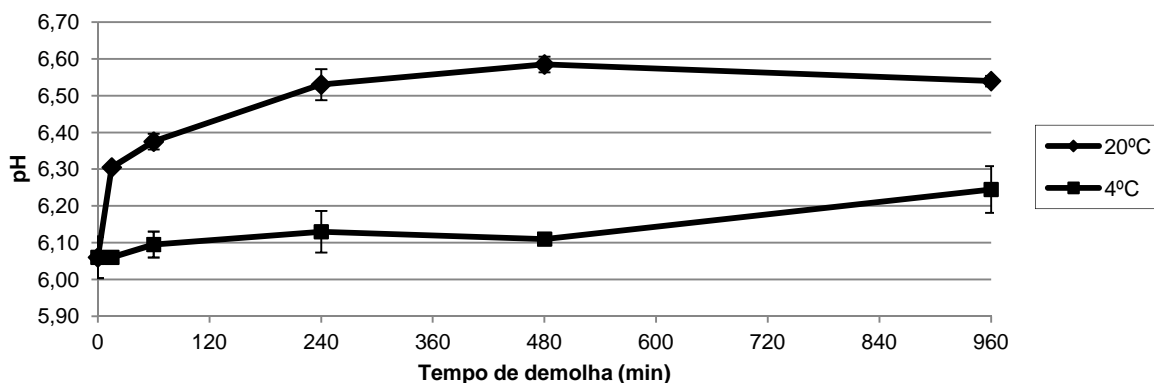


Figura 23 – Variação do pH ao longo do processo de demolha de bacalhau, a 4 e 20°C

No processo de demolha a 4°C ocorre uma alteração de pH de  $6,06 \pm 0,06$  até  $6,25 \pm 0,06$ , o que corresponde a uma diferença de 0,19. Na demolha a 20°C ocorre uma variação de pH de  $6,06 \pm 0,06$  até  $6,54 \pm 0,01$ , o que corresponde a uma diferença de 0,48. Em ambas as situações entre o valor inicial (0 minutos) e o valor final (960 minutos) os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). No entanto, na demolha à 4°C só o valor aos 960 minutos aumenta, enquanto na demolha a 20°C, o pH aumenta até os 240 minutos mantendo-se constante até os 960 minutos, sendo a variação de pH mais acentuada neste caso. Segundo Thorarinsdottir et al. (2002), os valores de pH aumentam de  $6,13 \pm 0,10$  em bacalhau salgado seco para  $6,66 \pm 0,03$  em bacalhau demolido (à temperatura ambiente), encontrando-se relativamente próximos dos valores obtidos neste trabalho para 20°C.

Durante a demolha, a quantidade de água no músculo do bacalhau aumenta, verificando-se o aumento da atividade da água ( $a_w$ ) e, consequentemente, um aumento do crescimento microbiano. A literatura refere que o crescimento microbiano em peixe promove o aumento do pH, uma vez que os microrganismos produzem compostos alcalinos, como, por exemplo, a TMA (Pascual-Anderson, 2000). Desta forma, pensa-se que o aumento do pH se deve ao aumento da quantidade destes compostos alcalinos devido a ação microbiológica, sendo menos acentuada a temperaturas mais baixas, uma vez que provavelmente o crescimento microbiológico é mais lento (levando à produção de menor quantidade de compostos alcalinos).

### 6.3. Variação da atividade enzimática no processo de demolha de bacalhau

#### 6.3.1. Fosfatase ácida

Na Tabela 14 e na Figura 24 está representada a variação da atividade da fosfatase ácida ao longo do processo de demolha até os 960 minutos. Em anexo (Anexo E1, Tabela 1) encontram-se também os resultados tabelados em gramas de bacalhau salgado.

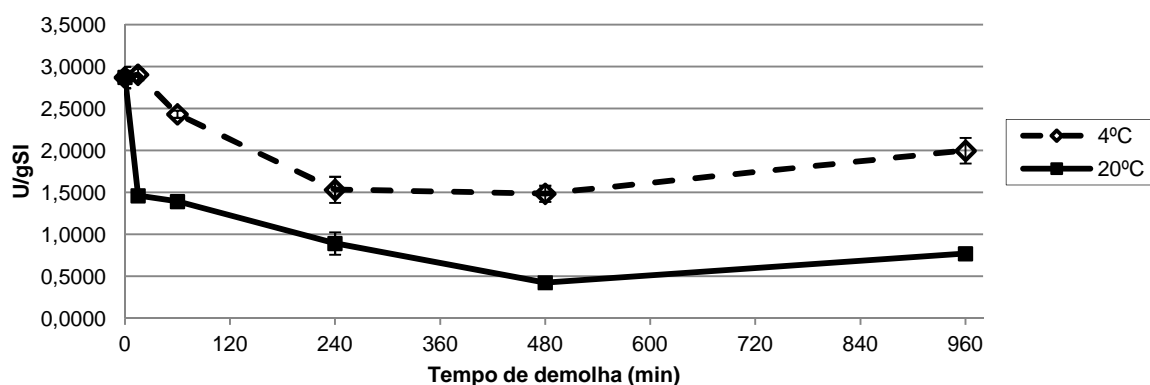
**Tabela 14** – Variação da atividade da fosfatase ácida (U/gSI) durante o processo de demolha de bacalhau

Tempo de demolha (min)	Atividade da fosfatase ácida (U/gSI)	
0*	2,8737±0,1269 <sup>a/a</sup>	
	4°C	20°C
15	2,9062±0,0669 <sup>ax</sup>	1,4640±0,0130 <sup>by</sup>
60	2,4343±0,0425 <sup>bx</sup>	1,3942±0,0265 <sup>by</sup>
240	1,5340±0,1562 <sup>dx</sup>	0,8948±0,1345 <sup>cy</sup>
480	1,4872±0,0961 <sup>dx</sup>	0,4268±0,0143 <sup>ey</sup>
960	1,9999±0,1528 <sup>cx</sup>	0,7725±0,0314 <sup>dy</sup>

Colunas: letras (a, b, c, d, e) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ );

Linhas: letras (x, y) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ );

\*Bacalhau salgado seco.



**Figura 24** – Variação da atividade da fosfatase ácida (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha

Tanto para a demolha a 4°C como para a demolha a 20°C, a atividade enzimática diminui ao longo do processo de demolha. O valor inicial de atividade é de 2,8737±0,1269 U/gSI, que é o correspondente ao bacalhau salgado seco. Para a demolha a 4°C, a atividade decresce para 1,5340±0,1562 U/gSI aos 240 minutos, mantendo-se aos 480 minutos e voltando a aumentar aos 960 minutos para o valor de 1,9999±0,1528 U/gSI. No caso da demolha a 20°C, a atividade diminui rapidamente nos primeiros 15 minutos para uma atividade de

1,4640±0,0130 U/gSI (valor semelhante ao obtido ao final de 240 minutos para a demolha a 4°C), que corresponde a uma diminuição de cerca de 50% em atividade, continuando a diminuir até os 480 minutos para um valor de atividade de 0,4268±0,0143 U/gSI e voltando a aumentar aos 960 minutos para 0,7725±0,0314 U/gSI. Ao longo da demolha os valores de atividade são estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ) entre as duas temperaturas, sendo sempre superiores para a demolha de bacalhau a 4°C.

A diminuição da atividade da enzima no músculo de bacalhau ao longo do tempo de demolha pode dever-se a várias razões, provavelmente, devido a:

- Perda da enzima para a água de demolha, uma vez que anteriormente também se concluiu que houve uma perda da proteína solúvel para água de demolha (para comprovar esta afirmação seria necessário realizar uma análise da atividade enzimática na água de demolha, o que será realizado em trabalho futuro);
- Efeito do conteúdo em sal no extrato enzimático na quantificação da atividade, dado que nas amostras de bacalhau a quantidade de sal diminui ao longo da demolha e isto reflete-se na quantidade de sal nos ensaios enzimáticos (este estudo será realizado no futuro).

O aumento da atividade no final da demolha (aos 960 minutos) pode ser devida a ação de microrganismos que podem provocar o aumento da quantidade de enzimas microbianas no músculo do bacalhau.

### 6.3.2. Catepsina B

Na Tabela 15 e na Figura 25 está representada a variação da atividade da catepsina B no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha. No Anexo E2 encontram-se os respetivos valores em gramas de bacalhau salgado.

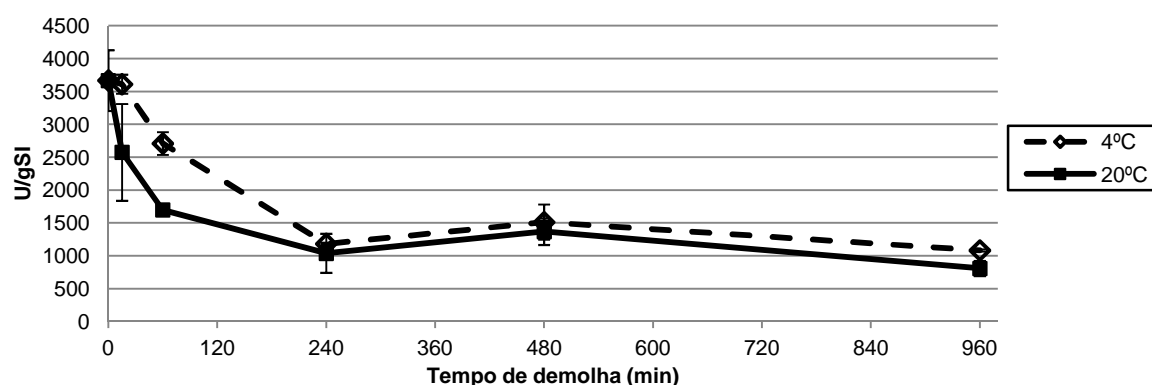
**Tabela 15** - Variação da atividade da catepsina B (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha

Tempo de demolha (min)	Atividade da catepsina B (U/gSI)	
0*	3667±463 <sup>a/a</sup>	
	4°C	20°C
15	3612±145 <sup>ax</sup>	2574±736 <sup>by</sup>
60	2709±174 <sup>bx</sup>	1698±66 <sup>cy</sup>
240	1183±17 <sup>cbx</sup>	1039±297 <sup>cdx</sup>
480	1513±268 <sup>cx</sup>	1370±204 <sup>cdx</sup>
960	1083±17 <sup>dx</sup>	808±116 <sup>dx</sup>

Colunas: letras (a, b, c, d, e) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ );

Linhas: letras (x, y) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ );

\*Bacalhau salgado seco.



**Figura 25** – Variação da atividade da catepsina B no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha

A atividade da catepsina B diminui com o processo de demolha de bacalhau. O valor inicial de atividade, isto é, a atividade no bacalhau salgado seco é de 3667±463 U/gSI. Até os 240 minutos de demolha, a atividade da catepsina B diminui até um valor de 1183±17 U/gSI (4°C) e 1039±297 U/gSI (20°C). A partir dos 240 minutos, a atividade da fosfatase mantém-se constante até os 960 minutos, não sendo estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre as duas temperaturas. Até os 240 minutos observa-se que a diminuição da atividade enzimática é menor na demolha a 4°C comparativamente com a demolha a 20°C.

Tal como acontece com a fosfatase ácida, a diminuição da atividade da catepsina B pode dever-se às mesmas razões.

### 6.3.3. Catepsina D

Na Tabela 16 e na Figura 26 está representada a variação da atividade da catepsina D no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha. No Anexo E3 encontram-se os respetivos valores em gramas de bacalhau salgado.

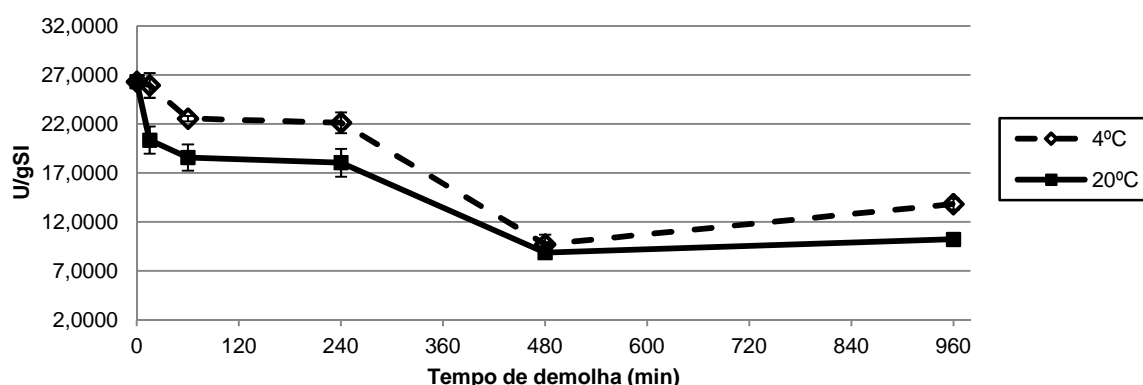
**Tabela 16** - Variação da atividade da catepsina D (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha

Tempo de demolha (min)	Atividade da catepsina D (U/gSI)	
0*	26,3284±0,6700 <sup>a/a</sup>	
	4°C	20°C
15	25,9504±1,2693 <sup>ax</sup>	20,3643±1,3947 <sup>by</sup>
60	22,5503±0,2783 <sup>bx</sup>	18,5789±1,3378 <sup>cy</sup>
240	22,1372±1,0577 <sup>bx</sup>	18,0463±1,4315 <sup>cy</sup>
480	9,6888±1,0193 <sup>dx</sup>	8,8514±0,2347 <sup>dx</sup>
960	13,8220±0,5766 <sup>cx</sup>	10,2222±0,2384 <sup>dy</sup>

Colunas: letras (a, b, c, d) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ );

Linhas: letras (x, y) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ );

\*Bacalhau salgado seco.



**Figura 26** – Variação da atividade da catepsina D (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha

\Observa-se na Figura 26 que a atividade da catepsina D diminui com o tempo de demolha de bacalhau, sendo mais acentuada para a demolha que ocorre a 20°C. O valor inicial de atividade é de 26,3284±0,6700 U/gSI, que corresponde ao valor de atividade da catepsina D em bacalhau salgado. Para a demolha a 4°C observa-se que diminui para 22,5503±0,2783 U/gSI aos 60 minutos, mantendo-se aos 240 minutos, mas diminuindo aos 480 minutos para 9,6888±1,0193 U/gSI e voltando a aumentar aos 960 minutos para 13,8220±0,5766 U/gSI. Para a demolha a 20°C, observa-se uma diminuição mais acentuada que a 4°C, sendo o comportamento muito parecido com o que

acontece a 4°C. Neste caso, nota-se que aos 15 minutos ocorre uma diminuição da atividade em 23%, passando para um valor de atividade de  $20,3643 \pm 1,3947$  U/gSI, continuando a diminuir para  $8,8514 \pm 0,2347$  U/gSI aos 480 minutos e mantendo-se sem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) aos 960 minutos. Os resultados da demolha à 4°C são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos resultados à 20°C, exceto a 480 minutos.

### 6.3.4. Lipase

Na Tabela 17 e na Figura 27 observa-se a variação da atividade da lipase no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha. Em anexo (Anexo E4) estão representados os resultados em função das gramas de bacalhau salgado.

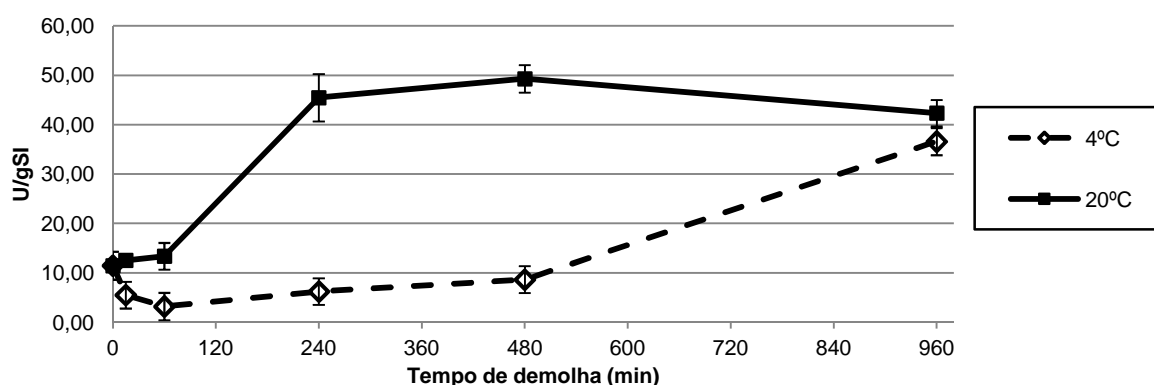
**Tabela 17** - Variação da atividade da lipase (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha

Tempo de demolha (min)	Atividade da lipase (U/gSI)	
0*	$11,45 \pm 2,83^{b/c}$	
	4°C	20°C
15	$5,50 \pm 2,72^{cdx}$	$12,52 \pm 0,53^{cy}$
60	$3,19 \pm 2,77^{dx}$	$13,35 \pm 2,72^{cy}$
240	$6,23 \pm 2,70^{cdx}$	$45,48 \pm 4,79^{ay}$
480	$8,64 \pm 2,72^{bcx}$	$49,30 \pm 2,80^{ay}$
960	$36,59 \pm 2,76^{ax}$	$42,33 \pm 2,67^{by}$

Colunas: letras (a, b, c, d) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ );

Linhas: letras (x, y) diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ );

\*Bacalhau salgado seco.



**Figura 27** – Variação da atividade da lipase (U/gSI) no músculo do bacalhau ao longo do processo de demolha

No bacalhau salgado seco, que corresponde ao valor inicial da Figura 27, a atividade da lipase é de  $11,45 \pm 2,83$  U/gSI. Observa-se que os resultados obtidos são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre as duas demolhas às duas temperaturas. Em ambas as demolhas, a 4 e 20°C, o valor de atividade da lipase aumenta até os 960 minutos. Para a demolha a 4°C, a atividade da lipase aumenta mais lentamente que para a demolha a 20°C, mantendo-se sem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) até os 480 minutos e aumentando aos 960 minutos para  $36,59 \pm 2,76$  U/gSI, que é 3x maior que o valor inicial. Para a demolha a 20°C, como já se enunciou, o aumento da atividade da lipase é mais rápida, mantendo-se sem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) até os 60 minutos, aumentando para  $45,48 \pm 4,79$  U/gSI aos 240 minutos e mantendo-se sem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) até os 960 minutos.

Não foi encontrado nada na literatura que explique a variação que ocorre com a atividade da lipase ao longo do processo de demolha às duas temperaturas.

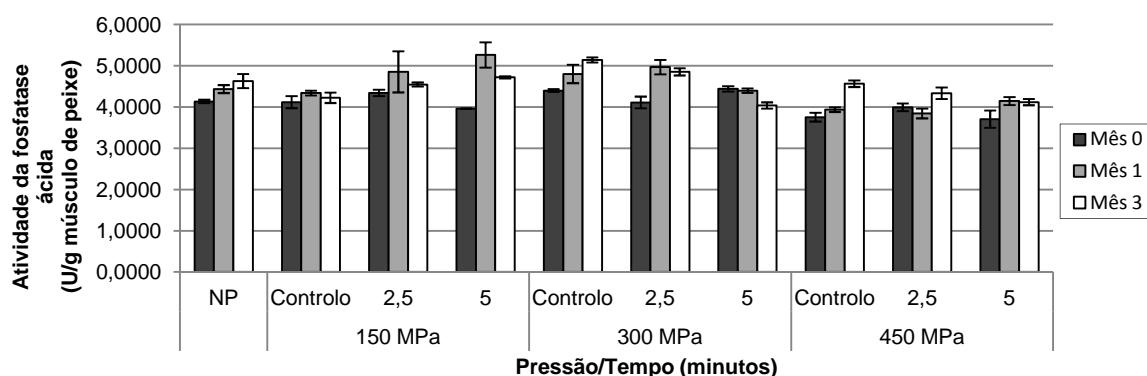


## Parte II. Efeito da alta pressão na atividade enzimática da cavala

### A. Atividade enzimática na cavala

#### 1. Atividade da fosfatase ácida

Na Figura 28 estão representados graficamente os valores obtidos para a atividade da fosfatase ácida em amostras de músculo de cavala.



**Figura 28** - Atividade da fosfatase ácida (U/g músculo de peixe) nos diferentes tratamentos (pressão/tempo) nas amostras de cavala. NP: Não processada. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Observa-se na Figura 28 que os tratamentos de alta pressão e tempo de pressurização não provocaram grandes variações na atividade da fosfatase ácida no músculo da cavala, mas no entanto observam-se que alguns resultados apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras tratadas.

Analisando os resultados obtidos para o mês 0 (Tabela 18), como forma de observar o efeito dos tratamentos de pressão e tempo de pressurização na atividade da fosfatase ácida no músculo de cavala, observa-se que a atividade da enzima diminui ligeiramente a 450 MPa e aumentando ligeiramente a pressões intermedias (300 MPa). A atividade da fosfatase ácida serve como indicador geral de libertação de enzimas lisossomais (Jung, Ghoul & de Lamballerie-Anton, 2000). Chéret et al. (2005) observaram que o músculo de robalo quando é pressurizado, a atividade da fosfatase ácida aumenta, indicando libertação de enzimas dos lisossomas. Deste modo, o aumento da atividade da enzima em

pressões intermédias (300 MPa) pode ser devido ao efeito da alta pressão nos lisossomas, causando a libertação das enzimas, e a posterior diminuição da atividade dever-se a inativação das enzimas.

**Tabela 18** – Valores obtidos para a atividade da fosfatase ácida (U/g músculo de peixe) para as diferentes pressões (MPa) e tempos de pressurização (minutos) para o mês 0, 1 e 3 de conservação. NP: Não processada. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Pressão (MPa)		Mês 0		
NP		4,1362±0,0404 <sup>b/b/b</sup>		
		Tempo de pressurização (min)		
		Controlo	2,5	5
150	4,1206±0,1465 <sup>by</sup>	4,3422±0,0766 <sup>ax</sup>	3,9621±0,0077 <sup>cy</sup>	
300	4,3982±0,0342 <sup>ax</sup>	4,1123±0,1413 <sup>by</sup>	4,4406±0,0677 <sup>ax</sup>	
450	3,7541±0,1056 <sup>cy</sup>	3,9951±0,0949 <sup>bx</sup>	3,7079±0,2098 <sup>dy</sup>	
Pressão (MPa)		Mês 1		
NP		4,4360±0,0966 <sup>b/b/b</sup>		
		Tempo de pressurização (min)		
		Controlo	2,5	5
150	4,3406±0,0577 <sup>bz</sup>	4,8528±0,4973 <sup>ay</sup>	5,2630±0,3087 <sup>ax</sup>	
300	4,8019±0,2223 <sup>ax</sup>	4,9678±0,1759 <sup>ax</sup>	4,3971±0,0565 <sup>yb</sup>	
450	3,9375±0,0551 <sup>cx</sup>	3,8456±0,1189 <sup>cx</sup>	4,1446±0,0970 <sup>xb</sup>	
Pressão (MPa)		Mês 3		
NP		4,6308±0,1690 <sup>b/b/a</sup>		
		Tempo de pressurização (min)		
		Controlo	2,5	5
150	4,2245±0,1261 <sup>cy</sup>	4,5480±0,0470 <sup>bx</sup>	4,7220±0,0252 <sup>ax</sup>	
300	5,1422±0,0634 <sup>ax</sup>	4,8550±0,0880 <sup>ay</sup>	4,0396±0,0754 <sup>bz</sup>	
450	4,5673±0,0805 <sup>xb</sup>	4,3333±0,1395 <sup>cy</sup>	4,1208±0,0767 <sup>bz</sup>	

Colunas: letras (a, b, c, d) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ );

Linhas: letras (x, y, z) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos relativamente ao efeito do tempo de conservação do músculo de cavala congelado na atividade da fosfatase ácida estão representados na Tabela 19. Após a análise estatística observa-se que nas amostras NP ocorre um aumento da atividade da enzima ao fim de 1 mês de conservação, mantendo-se no mês 3. No entanto, nas amostras tratadas o comportamento é diferente, notando-se o efeito significativo da alta pressão na enzima mesmo com o aumento do tempo de conservação. Nas amostras pressurizadas com 150 MPa durante 5 minutos observa-se que a atividade aumenta ao fim de 1 mês de conservação, diminuindo ao fim de 3 meses. Nas

amostras pressurizadas a 300 MPa, controlo e durante 2,5 minutos de pressurização, também se observa o aumento da atividade ao fim de 1 mês, mantendo-se posteriormente. A 450 MPa, a atividade aumenta no mês 3 tanto no controlo como com 2,5 minutos, mas com 5 minutos aumenta só com 1 mês de conservação, mantendo-se no mês 3.

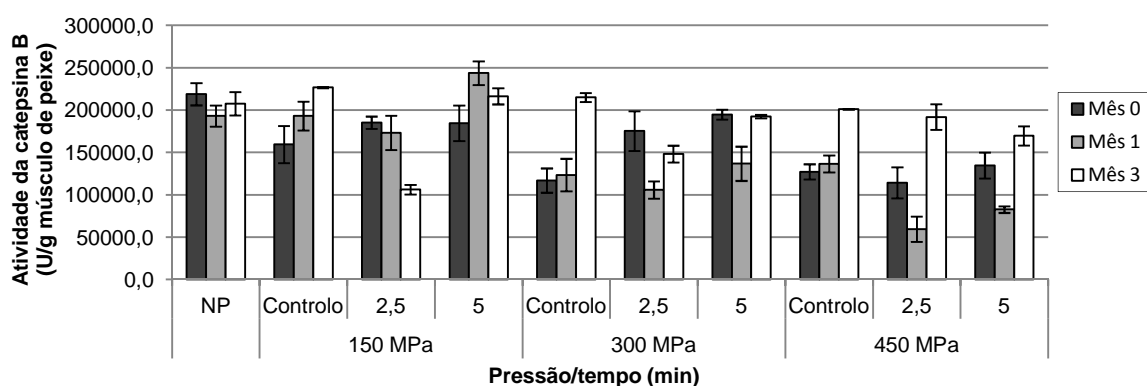
**Tabela 19** - Valores obtidos para a atividade da fosfatase ácida (U/g músculo de peixe) ao longo do tempo de conservação. NP: Não processada. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Pressão (MPa)	Tempo de pressurização (min)	Mês 0	Mês 1	Mês 3
NP	-	4,1362±0,0404 <sup>y</sup>	4,4360±0,0966 <sup>x</sup>	4,6308±0,1690 <sup>x</sup>
150	Controlo	4,1206±0,1465 <sup>x</sup>	4,3406±0,0577 <sup>x</sup>	4,2245±0,1261 <sup>x</sup>
	2,5	4,3422±0,0766 <sup>y</sup>	4,8528±0,4973 <sup>x</sup>	4,5480±0,0470 <sup>y</sup>
	5	3,9621±0,0077 <sup>z</sup>	5,2630±0,3087 <sup>x</sup>	4,7220±0,0252 <sup>y</sup>
300	Controlo	4,3982±0,0342 <sup>z</sup>	4,8019±0,2223 <sup>y</sup>	5,1422±0,0634 <sup>x</sup>
	2,5	4,1123±0,1413 <sup>y</sup>	4,9678±0,1759 <sup>x</sup>	4,8550±0,0880 <sup>x</sup>
	5	4,4406±0,0677 <sup>x</sup>	4,3971±0,0565 <sup>x</sup>	4,0396±0,0754 <sup>y</sup>
450	Controlo	3,7541±0,1056 <sup>y</sup>	3,9375±0,0551 <sup>y</sup>	4,5673±0,0805 <sup>x</sup>
	2,5	3,9951±0,0949 <sup>y</sup>	3,8456±0,1189 <sup>y</sup>	4,3333±0,1395 <sup>x</sup>
	5	3,7079±0,2098 <sup>y</sup>	4,1446±0,0970 <sup>x</sup>	4,1208±0,0767 <sup>x</sup>

Linhas: letras (x, y, z) indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 2. Atividade da catepsina B

Na Figura 29 estão representados os valores obtidos para a atividade da catepsina B para todos os tratamentos realizados no músculo de cavala.



**Figura 29** – Atividade da catepsina B (U/g músculo de peixe) nos diferentes tratamentos (pressão/tempo) nas amostras de cavala. NP: não processada. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Observa-se na Figura 29 que, de uma forma geral, os tratamentos realizados tem um efeito significativo ( $p<0,05$ ) na atividade da catepsina B presente no músculo da cavala. Na Tabela 20 está representado o estudo estatístico realizado para o mês 0 de conservação, observando-se que a atividade diminui a pressões maiores (450 MPa). No entanto, observa-se que na amostra controlo a 300 MPa também se observa uma diminuição da atividade enzimática.

**Tabela 20** – Valores obtidos para a atividade da catepsina B (U/g músculo de peixe) para as diferentes pressões (MPa) e tempos de pressurização (minutos) para o mês 0, 1 e 3 de conservação. NP: Não processado. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Pressão (MPa)		Mês 0	
NP		218838,8±13146,8 <sup>a/a/a</sup>	
Tempo de pressurização (min)			
	Controlo	2,5	5
150	159462,2±21891,2 <sup>bx</sup>	185196,2±7342,9 <sup>bx</sup>	184507,5±20975,7 <sup>bx</sup>
300	116947,0±14339,6 <sup>cy</sup>	175303,8±23325,1 <sup>bx</sup>	194828,2±5824,1 <sup>abx</sup>
450	127237,6±8999,0 <sup>cx</sup>	114199,8±18278,9 <sup>cx</sup>	134730,4±15291,3 <sup>cx</sup>
Pressão (MPa)		Mês 1	
NP		193081,6±12460,4 <sup>a/a/b</sup>	
Tempo de pressurização (min)			
	0	2,5	5
150	193126,0±17015,7 <sup>ay</sup>	173138,7±20249,6 <sup>ay</sup>	243737,7±14058,1 <sup>ax</sup>
300	123438,2±19204,7 <sup>bxy</sup>	105807,0±10118,2 <sup>by</sup>	136791,7±20225,0 <sup>cx</sup>
450	136601,7±9912,4 <sup>bx</sup>	59604,2±14912,5 <sup>cy</sup>	82686,0±3912,3 <sup>dy</sup>
Pressão (MPa)		Mês 3	
NP		207550,4±13806,2 <sup>ab/a/ab</sup>	
Tempo de pressurização (min)			
	0	2,5	5
150	226646,6±721,1 <sup>ax</sup>	106148,7±5613,0 <sup>cy</sup>	216330,4±9499,9 <sup>ax</sup>
300	214961,2±5279,0 <sup>abx</sup>	148161,2±9920,7 <sup>bz</sup>	192462,5±1918,1 <sup>by</sup>
450	201052,2±261,0 <sup>bx</sup>	191852,5±15163,8 <sup>ax</sup>	169746,4±11301,6 <sup>cy</sup>

Colunas: letras (a, b, c) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ );

Linhas: letras (x, y) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ).

Relativamente ao efeito da alta pressão ao longo do tempo de conservação (Tabela 21) observa-se que o tempo de conservação provoca diferenças significativas ( $p<0,05$ ) nos resultados obtidos. A 150 MPa durante 2,5 minutos observa-se uma diminuição da atividade enzimática ao fim de 3 meses de conservação. Para pressões superiores (300 e 450 MPa, durante 2,5 e 5 minutos) observa-se que a atividade da enzima diminui no mês 1, voltando a aumentar a

atividade ao fim de 3 meses. Estes resultados indicam que a pressão influencia a atividade da catepsina B ao longo do tempo de conservação, sendo neste caso mais significativa no mês 3.

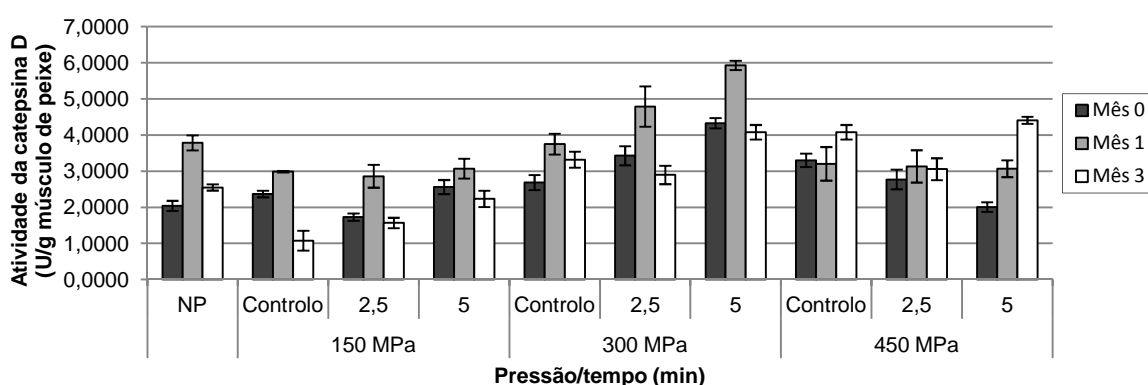
**Tabela 21** - Valores obtidos para a atividade da catepsina B (U/g músculo de peixe) ao longo do tempo de conservação. NP: Não processada. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Pressão (MPa)	Tempo de pressurização (min)	Mês 0	Mês 1	Mês 3
NP	-	218838,8±13146,8 <sup>x</sup>	193081,6±12460,4 <sup>y</sup>	207550,4±13806,2 <sup>xy</sup>
150	Controlo	159462,2±21891,2 <sup>z</sup>	193126,0±17015,7 <sup>y</sup>	226646,6±721,1 <sup>x</sup>
	2,5	185196,2±7342,9 <sup>x</sup>	173138,7±20249,6 <sup>x</sup>	106148,7±5613,0 <sup>y</sup>
	5	184507,5±20975,7 <sup>z</sup>	243737,7±14058,1 <sup>x</sup>	216330,4±9499,9 <sup>y</sup>
300	Controlo	116947,0±14339,6 <sup>y</sup>	123438,2±19204,7 <sup>y</sup>	214961,2±5279,0 <sup>x</sup>
	2,5	175303,8±23325,1 <sup>x</sup>	105807,0±10118,2 <sup>z</sup>	148161,2±9920,7 <sup>y</sup>
	5	194828,2±5824,1 <sup>x</sup>	136791,7±20225,0 <sup>y</sup>	192462,5±1918,1 <sup>x</sup>
450	Controlo	127237,6±8999,0 <sup>y</sup>	136601,7±9912,4 <sup>y</sup>	201052,2±261,0 <sup>x</sup>
	2,5	114199,8±18278,9 <sup>y</sup>	59604,2±14912,5 <sup>z</sup>	191852,5±15163,8 <sup>x</sup>
	5	134730,4±15291,3 <sup>y</sup>	82686,0±3912,3 <sup>z</sup>	169746,4±11301,6 <sup>x</sup>

Linhas: letras (x, y, z) indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 3. Atividade da catepsina D

Na Figura 30 estão representados os valores obtidos para a atividade da catepsina D no músculo da cavala após os tratamentos sob alta pressão.



**Figura 30** - Atividade da catepsina D (U/g músculo de peixe) nos diferentes tratamentos (pressão/tempo) nas amostras de cavala. NP: Não processado. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Pode observar-se que a alta pressão afeta a atividade da catepsina D, provocando diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), como se pode observar na Tabela

22. Observa-se que a atividade da enzima aumenta essencialmente em pressões intermédias (300 MPa). A pressão tem um efeito positivo nas enzimas lisossomais. O aumento da atividade pode dever-se à libertação das enzimas dos lisossomas. Este resultado também foi obtido por Chéret et al. (2005), que observaram um aumento da atividade a 300 MPa (5 minutos) e que quando pressurizavam o extrato sarcoplasmático nas mesmas condições ocorria inativação da enzima, uma vez que neste caso a enzima já tinha sido previamente libertada do lisossoma.

**Tabela 22** - Valores obtidos para a atividade da catepsina D (U/g músculo de peixe) para as diferentes pressões (MPa) e tempos de pressurização (minutos) para mês 0, 1 e 3 de conservação. NP: Não processado. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Pressão (MPa)		Mês 0		
NP		2,0404±0,1381 <sup>d/c/c</sup>		
		Tempo de pressurização (min)		
		Controlo	2,5	5
150	2,3673±0,0907 <sup>cx</sup>	1,7281±0,1004 <sup>dy</sup>	2,5594±0,1948 <sup>bx</sup>	
300	2,6831±0,2085 <sup>bz</sup>	3,4270±0,2651 <sup>by</sup>	4,3274±0,1403 <sup>ax</sup>	
450	3,3000±0,1862 <sup>ax</sup>	2,7688±0,2713 <sup>ay</sup>	2,0057±0,1341 <sup>cz</sup>	
Pressão (MPa)		Mês 1		
NP		3,7832±0,2094 <sup>a/b/b</sup>		
		Tempo de pressurização (min)		
		0	2,5	5
0,1			3,7832±0,2094 <sup>b</sup>	3,7832±0,2094 <sup>b</sup>
150	2,9881±0,0226 <sup>bx</sup>		2,8591±0,3166 <sup>cx</sup>	3,0681±0,2735 <sup>cx</sup>
300	3,7485±0,2884 <sup>az</sup>		4,7875±0,5575 <sup>ay</sup>	5,9277±0,1277 <sup>ax</sup>
450	3,2026±0,4644 <sup>bx</sup>		3,1312±0,4475 <sup>cx</sup>	3,0675±0,2337 <sup>cx</sup>
Pressão (MPa)		Mês 3		
NP		2,5481±0,0865 <sup>c/b/b</sup>		
		Tempo de pressurização (min)		
		0	2,5	5
0,1			2,5481±0,0865 <sup>b</sup>	2,5481±0,0865 <sup>b</sup>
150	1,0772±0,2732 <sup>dz</sup>		1,5663±0,1419 <sup>cy</sup>	2,2331±0,2256 <sup>bx</sup>
300	3,3203±0,2214 <sup>by</sup>		2,8955±0,2559 <sup>az</sup>	4,0781±0,2009 <sup>ax</sup>
450	4,0781±0,2009 <sup>ax</sup>		3,0548±0,3033 <sup>ay</sup>	4,4091±0,0992 <sup>ax</sup>

Colunas: letras (a, b, c) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ );

Linhas: letras (x, y, z) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Na Tabela 23 está representada a análise estatística realizada nos resultados obtidos para a atividade da catepsina D ao longo do tempo de conservação do músculo de cavala congelado. Observa-se que os resultados apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Desde as amostras NP até as

amostras processadas a 150 e 300 MPa observa-se um aumento da atividade da enzima no mês 1, diminuindo a atividade no mês 3. A 450 MPa observa-se que ocorre um aumento da atividade ao fim de 3 meses de conservação, tanto no controlo como nos 5 minutos de pressurização.

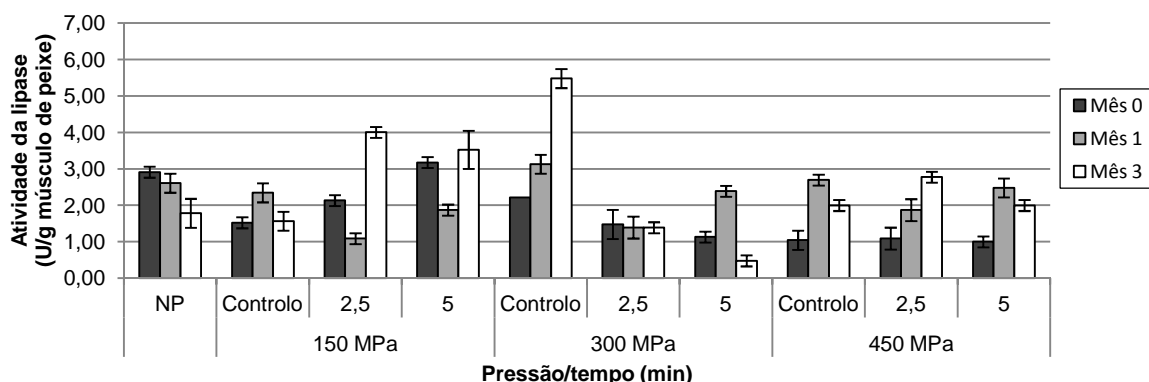
**Tabela 23** - Valores obtidos para a atividade da catepsina D (U/g músculo de peixe) ao longo do tempo de conservação. NP: Não processado. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Pressão (MPa)	Tempo de pressurização (min)	Mês 0	Mês 1	Mês 3
NP	-	2,0404±0,1381 <sup>z</sup>	3,7832±0,2094 <sup>x</sup>	2,5481±0,0865 <sup>y</sup>
	0	2,3673±0,0907 <sup>y</sup>	2,9881±0,0226 <sup>x</sup>	1,0772±0,2732 <sup>z</sup>
150	2,5	1,7281±0,1004 <sup>y</sup>	2,8591±0,3166 <sup>x</sup>	1,5663±0,1419 <sup>y</sup>
	5	2,5594±0,1948 <sup>y</sup>	3,0681±0,2735 <sup>x</sup>	2,2331±0,2256 <sup>y</sup>
300	0	2,6831±0,2085 <sup>z</sup>	3,7485±0,2884 <sup>x</sup>	3,3203±0,2214 <sup>y</sup>
	2,5	3,4270±0,2651 <sup>y</sup>	4,7875±0,5575 <sup>x</sup>	2,8955±0,2559 <sup>z</sup>
	5	4,3274±0,1403 <sup>y</sup>	5,9277±0,1277 <sup>x</sup>	4,0781±0,2009 <sup>y</sup>
450	0	3,3000±0,1862 <sup>y</sup>	3,2026±0,4644 <sup>y</sup>	4,0781±0,2009 <sup>x</sup>
	2,5	2,7688±0,2713 <sup>x</sup>	3,1312±0,4475 <sup>x</sup>	3,0548±0,3033 <sup>x</sup>
	5	2,0057±0,1341 <sup>z</sup>	3,0675±0,2337 <sup>y</sup>	4,4091±0,0992 <sup>x</sup>

Linhas: letras (x, y, z) indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Atividade da lipase

Na Figura 31 estão representados os valores obtidos para a atividade da lipase no músculo da cavala após os tratamentos de alta pressão.



**Figura 31** - Atividade da lipase (U/g músculo de peixe) nos diferentes tratamentos (pressão/tempo) nas amostras de cavala. NP: Não processado. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Na Tabela 24 está representada a análise estatística realizada aos resultados obtidos no mês 0 de conservação, observando-se que a aplicação de

alta pressão no músculo de cavala provoca um efeito significativo na atividade da lipase. Ocorre uma diminuição mais acentuada da atividade da enzima a 450 MPa, independentemente do tempo de pressurização utilizado. Também se observa que em todos os tratamentos ocorre uma diminuição da atividade da enzima comparativamente com a amostra NP, exceto na amostra tratada a 150 MPa durante 5 minutos, não apresentando diferenças significativas com a amostra NP.

**Tabela 24** - Valores obtidos para a atividade da lipase (U/g músculo de peixe) para as diferentes pressões (MPa) e tempos de pressurização (minutos) para mês 0, 1 e 3 de conservação. NP: Não processado. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Pressão (MPa)		Tempo de pressurização (min)	
NP		2,91±0,15 <sup>a/a/a</sup>	
0		2,5	5
150	1,52±0,15 <sup>cz</sup>	2,13±0,15 <sup>by</sup>	3,18±0,15 <sup>ax</sup>
300	2,22±0,00 <sup>bx</sup>	1,48±0,40 <sup>cy</sup>	1,13±0,15 <sup>bz</sup>
450	1,04±0,26 <sup>dx</sup>	1,09±0,30 <sup>dx</sup>	1,00±0,15 <sup>bx</sup>
Pressão (MPa)		Tempo de pressurização (min)	
NP		2,61±0,26 <sup>b/a/a</sup>	
0		2,5	5
150	2,34±0,26 <sup>bx</sup>	1,09±0,15 <sup>cz</sup>	1,87±0,15 <sup>by</sup>
300	3,13±0,26 <sup>ax</sup>	1,39±0,30 <sup>cz</sup>	2,39±0,15 <sup>ay</sup>
450	2,69±0,15 <sup>bx</sup>	1,87±0,30 <sup>by</sup>	2,48±0,26 <sup>ax</sup>
Pressão (MPa)		Tempo de pressurização (min)	
NP		1,78±0,40 <sup>b/c/b</sup>	
0		2,5	5
150	1,57±0,26 <sup>by</sup>	4,00±0,15 <sup>ax</sup>	3,52±0,52 <sup>ax</sup>
300	5,48±0,26 <sup>ax</sup>	1,39±0,15 <sup>cy</sup>	0,48±0,15 <sup>cz</sup>
450	2,00±0,15 <sup>by</sup>	2,77±0,15 <sup>bx</sup>	2,00±0,15 <sup>by</sup>

Colunas: letras (a, b, c) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ );

Linhas: letras (x, y, z) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Analisando estatisticamente os resultados obtidos ao longo do tempo de conservação do músculo da cavala (Tabela 25), observam-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Na amostra NP observa-se que a atividade da lipase diminui com o aumento do tempo de conservação, observando-se o contrário nas amostras tratadas, em que se observa um aumento da atividade com o aumento da conservação, sendo mais acentuado a 150 MPa durante 2,5 e 5 minutos, e a 300 MPa, na amostra controlo, em que aumenta ao fim de 3 meses de



conservação. A 300 MPa, durante 5 minutos, e a 450 MPa observa-se essencialmente um aumento no mês 1, diminuindo ao fim de 3 meses.

**Tabela 25** - Valores obtidos para a atividade da lipase (U/g músculo de peixe) ao longo do tempo de conservação. NP: Não processado. Controlo: corresponde a 0 minutos sob pressão, amostras só foram sujeitas ao aumento inicial/diminuição final da pressurização

Pressão (MPa)	Tempo de pressurização (min)	Mês 0	Mês 1	Mês 3
NP	-	2,91±0,15 <sup>x</sup>	2,61±0,26 <sup>x</sup>	1,78±0,40 <sup>y</sup>
	0	1,52±0,15 <sup>y</sup>	2,34±0,26 <sup>x</sup>	1,57±0,26 <sup>y</sup>
150	2,5	2,13±0,15 <sup>y</sup>	1,09±0,15 <sup>z</sup>	4,00±0,15 <sup>x</sup>
	5	3,18±0,15 <sup>x</sup>	1,87±0,15 <sup>y</sup>	3,52±0,52 <sup>x</sup>
300	0	2,22±0,00 <sup>z</sup>	3,13±0,26 <sup>y</sup>	5,48±0,26 <sup>x</sup>
	2,5	1,48±0,40 <sup>x</sup>	1,39±0,30 <sup>x</sup>	1,39±0,15 <sup>x</sup>
	5	1,13±0,15 <sup>y</sup>	2,39±0,15 <sup>x</sup>	0,48±0,15 <sup>z</sup>
450	0	1,04±0,26 <sup>z</sup>	2,69±0,15 <sup>x</sup>	2,00±0,15 <sup>y</sup>
	2,5	1,09±0,30 <sup>z</sup>	1,87±0,30 <sup>y</sup>	2,77±0,15 <sup>x</sup>
	5	1,00±0,15 <sup>z</sup>	2,48±0,26 <sup>x</sup>	2,00±0,15 <sup>y</sup>

Linhas: letras (x, y, z) diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Não foram encontrados dados na literatura que suportem os resultados obtidos para a atividade da lipase, sendo desta forma, difíceis de interpretar.

## **Capítulo IV – Conclusão**

Neste trabalho foi possível concluir que o nível de vácuo usado não afeta a a demolha do bacalhau quer à pressão atmosférica (0,1 MPa) quer sob pressão (200 MPa), concluindo-se que não afeta a difusão de sal e água.

A aplicação de ciclos sucessivos de 5 minutos de demolha sob alta pressão a 200 MPa, com troca de água de demolha e com dois níveis de vácuo (55 e 85%), não leva a vantagens, do ponto de vista da quantidade de sal e água difundidos.

A realização de uma demolha prévia à pressão atmosférica durante 30 minutos (período em que a demolha é mais rápida), seguida de uma demolha a 200 MPa (com troca de água de demolha com repouso de 60 minutos), permite aumentar a quantidade de sal difundido, para 65% do valor inicial, o que compara com o valor de 35%, conseguido apenas com a demolha sob alta pressão. Esta via de otimização da demolha é promissora e deve ser objeto de estudos mais aprofundados.

Os estudos realizados relativamente à variação da proteína solúvel, permitiram verificar que a concentração em proteína solúvel no músculo do bacalhau diminui ao longo da demolha, devido, principalmente, à sua solubilização na água de demolha. Relativamente aos resultados obtidos na análise do pH, verifica-se que este parâmetro vai aumentando com o decorrer da operação de demolha, o que pode ser justificado devido ao aumento da concentração de compostos alcalinos de origem microbiana. Os resultados permitem ainda concluir que, no caso da demolha efetuada a temperatura mais baixa (4°C), a variação do pH é menos acentuada, logo indicadora de menor crescimento microbiano.

No estudo da variação da atividade enzimática ao longo da demolha, conclui-se que: I – a atividade da fosfatase ácida, da catepsina B e da catepsina D diminuem ao longo do tempo de demolha para ambas as temperaturas, o que pode ser devido a: i) Perda da enzima para a água de demolha, uma vez que também se observou perda da proteína solúvel para a água de demolha; ii) Efeito

do conteúdo em sal no extrato enzimático na quantificação da atividade, dado que nas amostras de bacalhau a quantidade de sal diminui ao longo da demolha e isto reflete-se na quantidade de sal nos ensaios enzimáticos; II - A atividade da lipase tem um comportamento diferente das outras enzimas, observando-se que na demolha a 4°C a atividade se mantém constante até os 480 minutos de demolha aumentando aos 960 minutos (3x maior que o valor inicial). Na demolha a 20°C a atividade da lipase aumenta aos 240 minutos mantendo-se constante até os 960 minutos (4x maior que o valor inicial).

Na parte II, conclui-se que tanto a pressão, o tempo de pressurização e o tempo de conservação têm um efeito significativo na atividade enzimática do músculo de cavala. O efeito da alta pressão foi menos acentuado no caso da atividade da fosfatase ácida. Na catepsina B observa-se que existe tendência para diminuição da atividade para pressões superiores (450 MPa) para as amostras analisadas logo após a congelação (mês 0), observando-se um aumento com o aumento do tempo de conservação das amostras congeladas. Na catepsina D observa-se que a 300 MPa a atividade da enzima aumenta, este resultado já tinha sido obtido em estudos com robalo, justificando o aumento por libertação da enzima dos lisossomas devido aos rompimentos destes pela pressão. Na lipase observou-se um maior efeito da pressão, ocorrendo uma diminuição maior da atividade a 450 MPa no mês 0, aumentando com tempo de conservação.

## **Trabalho futuro**

Em termos de trabalho futuro, existem muitas linhas de desenvolvimento que podem ser seguidas.

Relativamente à otimização da demolha de bacalhau, que tem como objetivo diminuir o tempo de demolha, seria interessante continuar os ensaios sob pressão (200 MPa). Podia-se realizar a repetição do ensaio 30 minutos (0,1 MPa) mais 1 minuto (200 MPa), com 60 minutos de repouso, para se confirmar o resultado obtido relativamente à diminuição do conteúdo em sal no equilíbrio, e posteriormente tentar ensaios com maior tempo sob pressão, tais como 2 ou 3 minutos, como também tentar reduzir o tempo de espera em repouso.

Na análise das enzimas, fosfatase ácida e catepsinas B e D, durante a demolha de bacalhau, observou-se que a atividade enzimática diminui ao longo do tempo de demolha, desde modo, sugeria fazer uma análise da atividade na água de demolha, de forma a confirmar se as enzimas poderiam ter-se solubilizado na água durante a demolha, tal como se observou nas proteínas solúveis.

Também seria interessante realizar a quantificação microbiológica como forma de comprovação dos resultados obtidos relativamente ao pH.



**Referências bibliográficas**

(2008). Bacalhau do atlântico.

Aas, G. H., Skjerdal, O. T., Stoknes, I., & Bjorkevoll, I. (2010). Effects of Packaging Method on Salt-Cured Cod Yield and Quality During Storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 19(3), 149-161.

Ahromrit, A., Ledward, D. A., & Niranjana, K. (2006). High pressure induced water uptake characteristics of Thai glutinous rice. *Journal of Food Engineering*, 72(3), 225-233.

Al-Omirah, H. F. (1996). Proteolytic degradation products as indicators of quality in meat and fish. *Department of Food Science and Agricultural Chemistry*, vol. Master of Science. Montreal: Macdonald Campus McGill University.

Alasalvar, C., & Taylor, T. (2002). *Seafoods - Quality, technology and nutritional applications*. Tokyo: Springer.

Andrés, A., Rodríguez-Barona, S., & Barat, J. M. (2005). Analysis of some cod-desalting process variables. *Journal of Food Engineering*, 70(1), 67-72.

Angsupanich, K., & Ledward, D. A. (1998). High pressure treatment effects on cod (*Gadus morhua*) muscle. *Food Chemistry*, 63(1), 39-50.

Ashie, I. N. A., & Simpson, B. K. (1996). Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration. *Food Research International*, 29(5-6), 569-575.

Barat, J. M., Gallart-Jornet, L., Andrés, A., Akse, L., Carlehög, M., & Skjerdal, O. T. (2006). Influence of cod freshness on the salting, drying and desalting stages. *Journal of Food Engineering*, 73(1), 9-19.

Barat, J. M., Rodríguez-Barona, S., Andrés, A., & Fito, P. (2003). Cod salting manufacturing analysis. *Food Research International*, 36(5), 447-453.

Barat, J. M., Rodríguez-Barona, S., Andrés, A., & Ibáñez, J. B. (2004a). Modeling of the Cod Desalting Operation. *Journal of Food Science*, 69(4), FEP183-FEP189.

Barat, J. M., Rodríguez-Barona, S., Andrés, A., & Visquert, M. (2004b). Mass transfer analysis during the cod desalting process. *Food Research International*, 37(3), 203-208.

- Barat, J. M., Rodríguez-Barona, S., Castelló, M., Andrés, A., & Fito, P. (2004c). Cod desalting process as affected by water management. *Journal of Food Engineering*, 61(3), 353-357.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. New York: Springer.
- Burgaard, M. G. (2010). Effect of frozen storage temperature on quality-related changes in fish muscle. vol. PhD Thesis. Denmark: Technical University of Denmark.
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science*, 46(3), 211-236.
- Cheret, R., Delbarre-Ladrat, C., de Lamballerie-Anton, M., & Verrez-Bagnis, V. (2005). High-Pressure Effects on the Proteolytic Enzymes of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3969-3973.
- Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton, M. d., & Verrez-Bagnis, V. (2007). Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry*, 101(4), 1474-1479.
- Defaye, A. B., Ledward, D. A., MacDougall, D. B., & Tester, R. F. (1995). Renaturation of metmyoglobin subjected to high isostatic pressure. *Food Chemistry*, 52(1), 19-22.
- Delbarre-Ladrat, C., Cheret, R., Taylor, R., & Verrez-Bagnis, V. (2006). Trends in postmortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(5), 409-421.
- Hamada-Sato, N., Usui, K., Kobayashi, T., Imada, C., & Watanabe, E. (2005). Quality assurance of raw fish based on HACCP concept. *Food Control*, 16(4), 301-307.
- Haouet, M., Altissimi, M., Framboas, M., & Galarini, R. (2006). Validation of the Volhard method for chloride determination in food. *Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement*, 11(1), 23-28.

- Helfman, G. S., Collette, B. B., Facey, D. E., & Bowen, B. W. (2009). *The diversity of fishes: biology, evolution and ecology*. Wiley-Blackwell.
- Hui, Y. H. (2006). *Food biochemistry and food processing*. Iowa, USA: Blackwell publishing.
- Hultmann, L. (2004). Endogenous proteolytic enzymes - Studies of their impact on fish muscle proteins and texture. *Department of Biotechnology*, vol. Master's Thesis. Norway: Faculty of Natural Sciences and Technology.
- Jiang, S.-T., Lee, J.-J., & Chen, H.-C. (1994). Purification and Characterization of Cathepsin B from Ordinary Muscle of Mackerel (*Scomber australasicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(5), 1073-1079.
- Jung, S., Ghoul, M., & de Lamballerie-Anton, M. (2000). Changes in lysosomal enzyme activities and shear values of high pressure treated meat during ageing. *Meat Science*, 56(3), 239-246.
- Kuda, T., Matsumoto, C., & Yano, T. (2002). Changes in acid and alkaline phosphatase activities during the spoilage of raw muscle from horse mackerel *Trachurus japonicus* and gurnard *Lepidotriga microptera*. *Food Chemistry*, 76(4), 443-447.
- Kurtovic, I., Marshall, S., Zhao, X., & Simpson, B. (2009). Lipases from Mammals and Fishes. *Reviews in Fisheries Science*, 17(1), 18-40.
- Lakshmanan, R., Patterson, M. F., & Piggott, J. R. (2005). Effects of high-pressure processing on proteolytic enzymes and proteins in cold-smoked salmon during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 90(4), 541-548.
- Lauritzsen, K. (2004). Quality of salted cod (*Gadus morhua* L.) as influenced by raw material and salt composition. *Norwegian College of Fishery Science*, vol. Dr. scient. thesis. Tromsø: University of Tromsø.
- Lee, Y. H., & Chang, H. N. (1990). Production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in an aqueous two-phase system. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 69(2), 89-92.
- Lorentzen, G., Olsen, R. L., Bjorkevoll, I., Mikkelsen, H., & Skjerdal, T. (2010a). Survival of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in muscle of



- cod (*Gadus morhua* L.) during salt-curing and growth during chilled storage of rehydrated product. *Food Control*, 21(3), 292-297.
- Lorentzen, G., Ytterstad, E., Olsen, R. L., & Skjerdal, T. (2010b). Thermal inactivation and growth potential of *Listeria innocua* in rehydrated salt-cured cod prepared for ready-to-eat products. *Food Control*, 21(8), 1121-1126.
- Martínez-Alvarez, O., & Gómez-Guillén, M. C. (2005). The effect of brine composition and pH on the yield and nature of water-soluble proteins extractable from brined muscle of cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 92(1), 71-77.
- Muñoz-Guerrero, H., Gutiérrez, M. d. R., Vidal-Brotons, D., Barat, J. M., Gras, M. L., & Alcaina, M. I. (2010). Environmental management of the residual brine of cod desalting. Quantification of mass transfer phenomena and determination of some parameters on the residual brine important for its treatment by membrane technology. *Journal of Food Engineering*, 99(4), 424-429.
- Muthukumarappan, K., & Gunasekaran, S. (1992). Above-atmospheric hydration of corn. *Transactions of the ASAE*, 35(6), 1885-1889.
- Nayak, J., Viswanathan, P. G. N., Ammu, K., & Mathew, S. (2003). Lipase activity in different tissues of four species of fish: rohu (*Labeo rohita* Hamilton), oil sardine (*Sardinella longiceps* Linnaeus), mullet (*Liza subviridis* Valenciennes) and Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta* Cuvier). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(11), 1139-1142.
- Ohmori, T., Shigehisa, T., Taji, S., & Hayashi, R. (1992). Biochemical Effects of High Hydrostatic Pressure on the Lysosome and Proteases Involved in It *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56 (8), 1285-1288.
- Ohsumi, Y., Ishikawa, T., & Kato, K. (1983). A Rapid and Simplified Method for the Preparation of Lysosomal Membranes from Rat Liver. *Journal of Biochemistry*, 93(2), 547-556.
- Pascual-Anderson, M. R. (2000). *Microbiología alimentaria. Metodología para alimentos y bebidas*. Madrid: Díaz de Santos S.A.

- Rahman, M. S. (2007). *Handbook of food preservation*. Food science and technology.
- Rastogi, N. K., & Niranjana, K. (1998). Enhanced Mass Transfer During Osmotic Dehydration of High Pressure Treated Pineapple. *Journal of Food Science*, 63(3), 508-511.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjana, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69-112.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Niranjana, K., & Knorr, D. (2002). Recent developments in osmotic dehydration: methods to enhance mass transfer. *Trends in Food Science and Technology*, 13(2), 48-59.
- Salvador, Â. M. C. (2009). Efeito de alta pressão no processo de demolha de bacalhau *Departamento de Química*, vol. Mestrado. Aveiro: Universidade de Aveiro.
- Sopanakul, A., Ledward, D. A., & Niranjana, K. (2002). Mass Transfer During Sucrose Infusion into Potatoes under High Pressure. *Journal of Food Science*, 67(6), 2217-2220.
- Takashi Ohmori, T. S., Siro Taji and Rikimaru Hayashi (1992). Biochemical Effects of High Hydrostatic Pressure on the Lysosome and Proteases Involved in It *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56 (8), 1285-1288.
- Thorarinsdottir, K. (2010). The Influence of Salting Procedures on the Characteristics of Heavy Salted Cod. *Department of Food Technology, Engineering and Nutrition*, vol. Doctoral thesis. Lund, Sweden Lund University.
- Thorarinsdottir, K. A., Arason, S., Bogason, S. G., & Kristbergsson, K. (2001). Effects of Phosphate on Yield, Quality, and Water-Holding Capacity in the Processing of Salted Cod (*Gadus morhua*). *Journal of Food Science*, 66(6), 821-826.
- Thorarinsdottir, K. A., Arason, S., Geirsdottir, M., Bogason, S. G., & Kristbergsson, K. (2002). Changes in myofibrillar proteins during processing of salted

- cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 77(3), 377-385.
- Villacís, M. F., Rastogi, N. K., & Balasubramaniam, V. M. (2008). Effect of high pressure on moisture and NaCl diffusion into turkey breast. *LWT - Food Science and Technology*, 41(5), 836-844.
- Wilson, K., & Walker, J. (2000). *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. London: Cambridge University Press.
- Zare, Z. (2004). High pressure processing of fresh tuna fish and its effects on shelf life. *Department of Foodscience and Agricultural Chemistry*, vol. Master of Science. Montreal, Quebec, Canada: Macdonald Campus of McGill University.

## **Anexos**

### **Anexo A - Ensaaios complementares**

#### **1. Determinação do conteúdo em NaCl em soluções padrão**

##### **1.1. Método Condutivimétrico**

Para a possível utilização deste método na determinação da concentração de NaCl presentes nas amostras, mediram-se os valores de condutividade de soluções padrão com percentagem de NaCl entre 0,5 e 20% (m/v) com água destilada, obtendo-se os valores assinalados na Tabela 26 e na Figura 32. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente (aproximadamente, 20°C). Assim, como se pode observar na Figura 32, a condutividade não varia linearmente com a concentração na gama de valores representada. No entanto, para a gama entre os 0,5% e 5% verifica-se que a condutividade varia linearmente em função da concentração de NaCl na solução.

**Tabela 26** - Valores de condutividade em mS/cm para soluções padrões de NaCl, a temperatura ambiente

<b>NaCl (%)</b>	<b>Condutividade (mS/cm) à temperatura ambiente</b>
0,0	0,25 ± 0,00
0,5	9,05 ± 0,35
1,0	16,88 ± 0,39
2,0	31,90 ± 0,99
3,0	46,55 ± 0,07
4,0	58,65 ± 1,34
5,0	71,80 ± 0,14
6,0	82,95 ± 0,07
7,0	88,85 ± 1,06
8,0	103,60 ± 0,28
12,0	139,15 ± 0,07
16,0	175,15 ± 1,06
20,0	194,90 ± 0,42

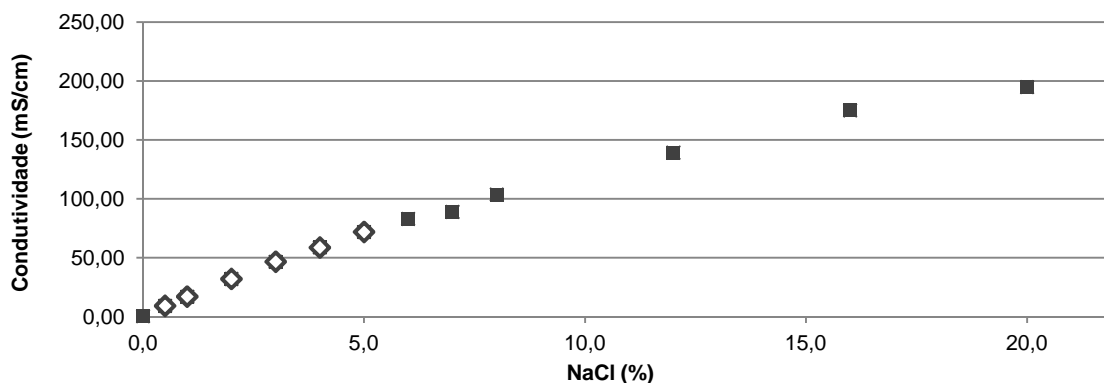


Figura 32 - Condutividade em função da concentração de NaCl (%) a temperatura ambiente

### Curva de calibração

Desta forma consegue-se fazer uma regressão linear nesta gama de concentrações, obtendo-se uma reta com a equação:  $y = 13,928x + 3,1573$  e com um coeficiente de correlação de 0,9981 (Figura 33).

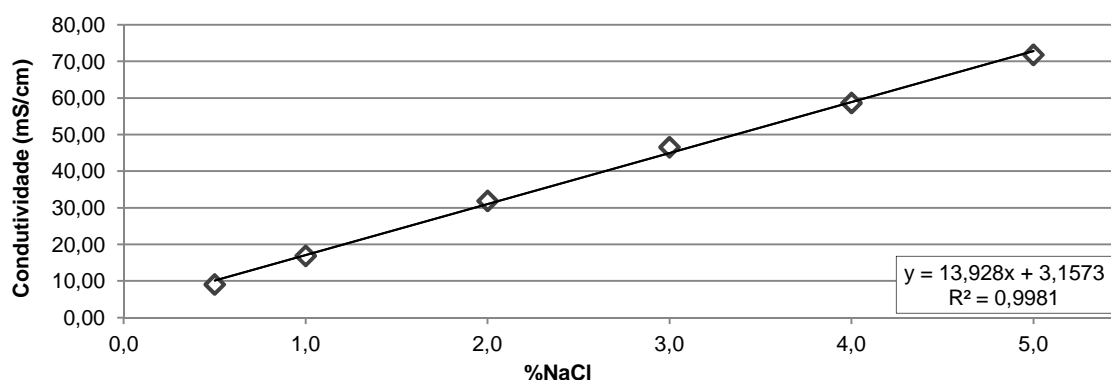


Figura 33 - Gama linear da condutividade em função da concentração de NaCl (%)

Assim, através da realização da curva de calibração é possível estimar o conteúdo de NaCl nas amostras de bacalhau e na água de demolha, dentro duma gama de concentração de NaCl entre 0,5 e 5%.

Deve salientar-se que durante estas experiências tentou-se sempre que possível controlar a temperatura ambiente, rondando os 20°C, uma vez que, e como já foi referido anteriormente, a condutividade varia com a temperatura, o que pode comprometer os resultados obtidos.

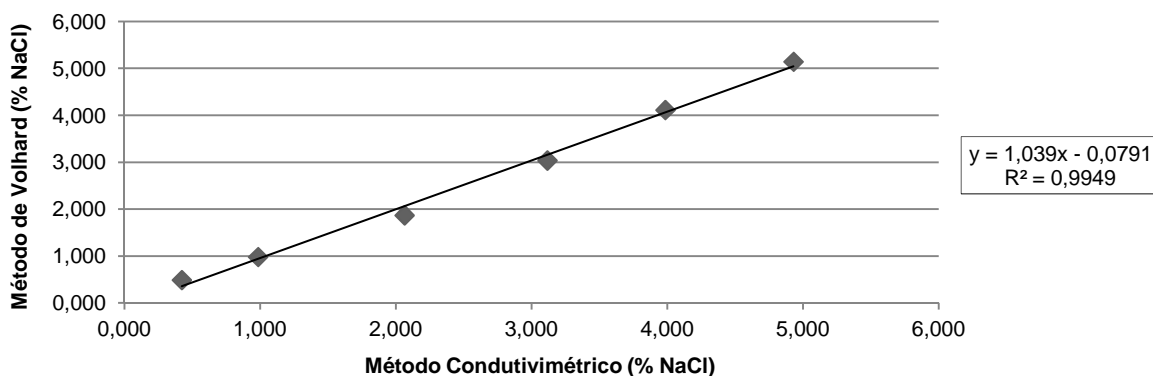
## 1.2. Comparação entre o método condutivimétrico e o método de Volhard

Como o método condutivimétrico é mais fácil e rápido de usar que o método de Volhard na quantificação do NaCl, estudou-se a correlação entre os dois métodos na gama linear anteriormente enunciada, apresentando-se os valores na Tabela 27. Pode observar-se que existem diferenças entre o valor obtido e o valor real do padrão para os dois métodos, sendo as diferenças inferiores para o método de Volhard.

**Tabela 27** - Valores de conteúdo em NaCl nas soluções padrão determinados através dos dois métodos

Solução padrão de NaCl (%)	% de NaCl (mét. cond.)	Diferença com o valor real (%) $\frac{\%_{Real} - \%_{Obtido}}{\%_{Real}} * 100$	% de NaCl (mét. Volhard)	Diferença com o valor real (%) $\frac{\%_{Real} - \%_{Obtido}}{\%_{Real}} * 100$	Diferença entre os dois métodos (%) $\frac{\%_{Cond.} - \%_{Volh.}}{\%_{Cond.}} * 100$
0,5	0,423	15,4	0,491	1,8	-16,1
1	0,985	1,5	0,982	1,8	0,3
2	2,065	-3,3	1,870	6,5	9,4
3	3,117	-3,9	3,039	-1,3	2,5
4	3,987	0,3	4,114	-2,9	-3,2
5	4,931	1,4	5,143	-2,8	-4,3

Na Figura 34 observa-se a correlação entre a percentagem de NaCl pelo método de Volhard em função da percentagem de NaCl quantificada pelo método condutivimétrico, verificando-se que o declive é muito próximo de 1 e com um coeficiente de correlação de 0,9949. Deste modo, o método condutivimétrico pode usar-se como um método rápido e simples.



**Figura 34** - Correlação entre o método de Volhard e o método condutivimétrico para a determinação da percentagem de NaCl

## Anexo B – Demolha de bacalhau a pressão atmosférica (0,1 MPa)

### Anexo B1 – Efeito do parâmetro $\alpha$ ( $\alpha=2$ e $\alpha=9$ )

**Tabela 28** - Valores da condutividade (mS/cm) da água de demolha ao longo do processo de demolha de bacalhau para  $\alpha=2$

Tempo de demolha (minutos)	Condutividade (mS/cm)
0	0,25 ± 0,00
30	8,83 ± 0,05
60	10,01 ± 0,36
90	11,84 ± 0,01
120	11,19 ± 0,13
180	13,85 ± 0,02
240	13,57 ± 0,02
360	15,09 ± 0,07
540	11,65 ± 0,03
840	14,53 ± 0,01
1200	14,93 ± 0,01

**Tabela 29** – Valores de quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl ao longo do processo de demolha do bacalhau para  $\alpha=2$

Tempo de demolha (min)	H <sub>2</sub> O			NaCl		
	gH <sub>2</sub> O/gSI	Percentagem (%)	mf/mi <sup>(1)</sup>	gNaCl/gSI	Percentagem (%)	mf/mi <sup>(1)</sup>
0	2,04	53,5	1,00	0,60±0,03	17,2±0,44	1,00±0,00
30	2,38	65,4	1,17	0,45±0,01	11,2±0,31	0,76±0,02
60	2,74	75,4	1,34	0,41±0,00	9,9±0,00	0,68±0,00
90	2,87	78,9	1,41	0,35±0,01	8,2±0,33	0,58±0,02
120	n.d.	n.d.	n.d.	0,33±0,01	8,0±0,32	0,55±0,02
180	2,92	80,4	1,43	0,33±0,00	7,8±0,00	0,55±0,00
240	2,88	79,4	1,41	0,28±0,03	6,5±0,61	0,47±0,04
360	2,95	81,2	1,45	0,23±0,00	5,6±0,00	0,39±0,00
540	2,92	80,3	1,43	0,26±0,02	6,0±0,50	0,44±0,04
840	3,07	84,6	1,51	0,22±0,00	4,7±0,00	0,36±0,00
1200	3,10	87,8	1,57	0,25±0,00	5,4±0,00	0,42±0,00

n.d. – Não determinado;

(1) – Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl.

**Tabela 30** - Valores da condutividade (mS/cm) da água de demolha ao longo do processo de demolha de bacalhau para  $\alpha=9$ 

Tempo de demolha (minutos)	Condutividade (mS/cm)
0*	0,25±0,00
4	3,68±0,04
15	6,20±0,22
30	6,95±0,25
60	9,41±0,13
120	10,63±0,28
240	12,74±0,58
360	13,16±0,48
540	12,59±0,81
840	12,49±0,21
1200	13,09±0,45

\*Água destilada.

**Tabela 31** - Valores de quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl ao longo do processo de demolha do bacalhau para  $\alpha=9$ 

Tempo de demolha (min)	H <sub>2</sub> O						NaCl					
	gH <sub>2</sub> O/gSI		Percentagem (%)		mf/mi <sup>(1)</sup>		gNaCl/gSI		Percentagem (%)		mf/mi <sup>(1)</sup>	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	1,4919	0,0552	49,5	1,7	1,0000	0,0000	0,524	0,032	17,4	1,1	1,000	0,000
4	1,8692	0,0478	57,0	1,5	1,2530	0,0320	0,422	0,010	12,9	0,3	0,805	0,018
15	2,0371	0,0356	60,3	1,1	1,3655	0,0239	0,352	0,008	10,8	0,3	0,697	0,020
30	2,1239	0,0681	62,3	1,6	1,4236	0,0457	0,279	0,028	8,2	0,7	0,536	0,047
60	2,1855	0,1542	61,6	3,9	1,4649	0,1034	0,195	0,031	5,7	0,8	0,384	0,047
120	2,3222	0,2859	64,4	7,2	1,5566	0,1917	0,199	0,015	5,6	0,4	0,384	0,034
240	2,4700	0,1938	66,6	4,9	1,6556	0,1299	0,138	0,007	3,5	0,2	0,247	0,014
360	2,6674	0,0557	70,2	1,5	1,7880	0,0373	0,094	0,007	2,6	0,1	0,187	0,007
540	2,6637	0,0643	70,2	1,7	1,7855	0,0431	0,055	0,022	1,5	0,6	0,111	0,044
840	2,7791	0,1533	70,0	3,7	1,8628	0,1028	0,091	0,014	2,1	0,3	0,159	0,026
1200	2,7311	0,0907	71,7	2,2	1,8306	0,0608	0,078	0,008	2,2	0,3	0,161	0,022

(1) – Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl;

DP = Desvio padrão.



## Anexo B2 – Efeito do vácuo para $\alpha = 2$

**Tabela 32** – Valores de quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl em g/gSI, percentagem e massa final/massa inicial para pressão atmosférica, sem sujeitar a vácuo, e  $\alpha$  igual a 2

Tempo de demolha (min)	Sem vácuo								
	H <sub>2</sub> O			NaCl					
	gH <sub>2</sub> O/gSI	%	mf/mi <sup>(1)</sup>	gNaCl/gSI		%		mf/mi <sup>(1)</sup>	
				Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	2,04	53,5	1,00	0,60	0,03	17,22	0,44	1,00	0,00
30	2,38	65,4	1,17	0,45	0,01	11,25	0,31	0,76	0,02
60	2,74	75,4	1,34	0,41	0,00	9,89	0,00	0,68	0,00
90	2,87	78,9	1,41	0,35	0,01	8,18	0,33	0,58	0,02
120	N.d.	N.d.	N.d.	0,33	0,01	8,02	0,32	0,55	0,02
180	2,92	80,4	1,43	0,33	0,00	7,79	0,00	0,55	0,00
240	2,88	79,4	1,41	0,28	0,03	6,49	0,61	0,47	0,04
360	2,95	81,2	1,45	0,23	0,00	5,61	0,00	0,39	0,00
540	2,92	80,3	1,43	0,26	0,02	6,02	0,50	0,44	0,04
840	3,07	84,6	1,51	0,22	0,00	4,68	0,00	0,36	0,00
1200	3,19	87,8	1,57	0,25	0,00	5,39	0,00	0,42	0,00

(1) – Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl;

DP = Desvio padrão;

N.d. – Não determinado.

**Tabela 33** - Valores de quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl em g/gSI, percentagem e massa final/massa inicial para pressão atmosférica, para um nível de vácuo de 55%, e  $\alpha$  igual a 2

Tempo de demolha (min)	55% vácuo								
	H <sub>2</sub> O			NaCl					
	gH <sub>2</sub> O/gSI	%	mf/mi <sup>(1)</sup>	gNaCl/gSI		%		mf/mi <sup>(1)</sup>	
				Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	2,04	53,5	1,00	0,596	0,031	17,2	0,0	1,00	0,00
30	2,48	59,6	1,22	0,466	0,010	11,2	0,2	0,78	0,02
60	2,59	61,7	1,27	0,431	0,002	10,3	0,1	0,72	0,00
90	2,65	64,3	1,30	0,363	0,013	8,8	0,3	0,61	0,02
120	N.d.	N.d.	N.d.	0,313	0,003	7,6	0,1	0,52	0,01
180	2,85	65,8	1,40	0,300	0,021	6,9	0,5	0,50	0,04
240	3,12	67,7	1,53	0,310	0,001	6,7	0,0	0,52	0,00
360	3,18	68,3	1,56	0,291	0,002	6,3	0,0	0,49	0,00
540	3,14	68,4	1,54	0,289	0,001	6,3	0,0	0,48	0,00
840	3,45	74,9	1,69	0,243	0,007	5,3	0,2	0,41	0,01
1200	3,29	71,4	1,62	0,228	0,000	5,0	0,0	0,38	0,00

(1) – Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl;

DP = Desvio padrão;

N.d. – Não determinado.

**Tabela 34** - Valores de quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl em g/gSI, percentagem e massa final/massa inicial para pressão atmosférica, para um nível de vácuo de 85%, e  $\alpha$  igual a 2

Tempo de demolha (min)	85% vácuo											
	H <sub>2</sub> O						NaCl					
	gH <sub>2</sub> O/gSI		%		mf/mi <sup>(1)</sup>		gNaCl/gSI		%		mf/mi <sup>(1)</sup>	
							Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	2,04	0,13	53,5	0,2	1,00	0,00	0,60	0,03	17,2	0,4	1,00	0,00
60	2,523	0,111	62,0	2,7	1,2373	0,0545	0,402	0,005	9,9	0,1	0,675	0,008
120	2,668	0,080	63,9	1,9	1,3085	0,0392	0,388	0,005	9,3	0,1	0,650	0,008
360	2,874	0,113	66,3	2,6	1,4094	0,0556	0,319	0,007	7,4	0,2	0,536	0,012
540	2,930	0,013	68,0	0,3	1,4368	0,0066	0,304	0,002	7,1	0,0	0,511	0,003
840	2,618	0,112	64,5	2,8	1,2838	0,0549	0,227	0,004	5,6	0,1	0,381	0,006
1200	2,693	0,020	65,7	0,5	1,3209	0,0100	0,206	0,005	5,0	0,1	0,345	0,009

(1) – Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl;

DP = Desvio padrão

## Anexo C – Demolha de bacalhau sob alta pressão (200 MPa)

### Anexo C1 - Efeito do parâmetro $\alpha$ ( $\alpha=2$ e $\alpha=9$ )

**Tabela 35** – Quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl para alfa igual a 2, com vácuo a 85%

Tempo de demolha (min)	H <sub>2</sub> O						NaCl					
	gH <sub>2</sub> O/gSI		Percentagem (%)		mf/mi <sup>(1)</sup>		gNaCl/gSI		Percentagem (%)		mf/mi <sup>(1)</sup>	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	1,1176	0,1545	43,3	6,0	1,0000		0,464	0,003	18,0	0,1	1,000	
0,08	1,5353	0,0097	55,2	0,3	1,3737	0,0086	0,3702	0,004	13,3	0,1	0,798	0,009
1	1,5149	0,0632	54,2	2,3	1,3555	0,0566	0,382	0,016	13,7	0,6	0,823	0,034
2	1,5353	0,0192	55,0	0,7	1,3737	0,0172	0,406	0,016	14,5	0,6	0,875	0,034
3	1,5079	0,0186	54,6	0,7	1,3492	0,0167	0,407	0,009	14,7	0,3	0,876	0,019

(1) – Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl.

**Tabela 36** – Quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl para alfa igual a 9, com vácuo a 85%

Tempo de demolha (min)	H <sub>2</sub> O						NaCl					
	gH <sub>2</sub> O/gSI		Percentagem (%)		mf/mi <sup>(1)</sup>		gNaCl/gSI		Percentagem (%)		mf/mi <sup>(1)</sup>	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	1,4919	0,0552	49,5	1,7	1,0000		0,524	0,032	17,4	1,1	1,000	
0,08	1,8595	0,0380	54,6	1,1	1,2464	0,0254	0,4177	0,024	12,3	0,7	0,797	0,045
0,5	1,7505	0,0912	51,8	2,7	1,1733	0,0611	0,403	0,009	11,9	0,3	0,768	0,017
1	1,7895	0,0600	52,7	1,8	1,1995	0,0402	0,398	0,000	11,7	0,0	0,759	0,001
2	1,7895	0,0018	52,9	0,1	1,1995	0,0012	0,379	0,008	11,2	0,2	0,723	0,014
3	1,8690	0,0088	54,7	0,3	1,2528	0,0059	0,398	0,003	11,6	0,1	0,759	0,005
4	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.	0,376	0,006	11,1	0,2	0,718	0,012
5	1,9433	0,0644	55,7	1,8	1,3026	0,0432	0,358	0,013	10,3	0,4	0,684	0,024
10	1,8948	0,0430	55,5	1,3	1,2701	0,0288	0,386	0,007	11,3	0,2	0,736	0,014
18	1,9081	0,0244	54,8	0,7	1,2790	0,0164	0,369	0,009	10,6	0,3	0,705	0,017

N.d. – Não determinado;

(1) – Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl.

**Tabela 37** – Valores em massa final/massa inicial para dois níveis de vácuo, 55 e 85%, para  $\alpha$  igual a 2, sob alta pressão (200 MPa)

Tempo de demolha (min)	Vácuo: 55%		Vácuo: 85%			
	200 MPa		200 MPa		Controlo: 0.1 MPa	
	H <sub>2</sub> O	NaCl	H <sub>2</sub> O	NaCl	H <sub>2</sub> O	NaCl
0	1,0000	1,000	1,0000	1,000	1,0000	1,000
0,08	1,3526±0,0037	0,861±0,002	1,3737±0,0086	0,798±0,009	1,3080±0,0114	0,825±0,007
1	1,3006±0,0023	0,878±0,005	1,3555±0,0566	0,823±0,034	1,2845±0,0283	0,854±0,008
2	1,3282±0,0089	0,839±0,001	1,3737±0,0172	0,875±0,034	1,3400±0,0265	0,863±0,014
3	1,3465±0,0115	0,805±0,003	1,3492±0,0167	0,876±0,019	1,4151±0,1055	0,799±0,004
5	1,3774±0,0085	0,783±0,001	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
10	1,4392±0,0019	0,793±0,005	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
15	1,4271±0,0159	0,791±0,003	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.

N.d. – Não determinado.

## Anexo C2 – Efeito do vácuo a 200 MPa

**Tabela 38** – Quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl para alfa igual a 9, com 30% vácuo

Tempo de demolha (min)	H <sub>2</sub> O – 200 MPa						H <sub>2</sub> O – Controlo*					
	gH <sub>2</sub> O/gSI		Percentagem (%)		mf/mi**		gH <sub>2</sub> O/gSI		Percentagem (%)		mf/mi**	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP
0	1,1176	0,1545	43,3	6,0	1,0000		1,1176	0,1545	43,3	6,0	1,0000	
0,08	1,5326	0,0171	55,6	0,6	1,3713	0,0153	1,5008	0,0006	55,2	0,0	1,3428	0,0005
1	1,5363	0,0321	55,1	1,2	1,3746	0,0288	1,5187	0,0108	55,0	0,4	1,3589	0,0097
2	1,5983	0,0499	56,6	1,8	1,4301	0,0447	1,5223	0,0202	54,9	0,7	1,3621	0,0181
3	1,7775	0,1181	59,6	4,0	1,5904	0,1057	1,5302	0,0155	54,6	0,6	1,3691	0,0138

Tempo de demolha (min)	NaCl						NaCl – Controlo*					
	gNaCl/gSI		Percentagem (%)		mf/mi**		gNaCl/gSI		Percentagem (%)		mf/mi**	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP
0	0,464	0,003	18,0	0,1	1,000		0,464	0,003	18,0	0,1	1,000	
0,08	0,384	0,016	13,9	0,6	0,827	0,035	0,3720	0,005	13,7	0,2	0,802	0,011
1	0,385	0,000	13,8	0,0	0,830	0,000	0,3822	0,003	13,8	0,1	0,824	0,005
2	0,372	0,010	13,2	0,4	0,801	0,022	0,3788	0,013	13,7	0,5	0,816	0,028
3	0,337	0,006	11,3	0,2	0,727	0,012	0,3504	0,001	12,5	0,0	0,755	0,001

\*Ensaio de controlo realizados a pressão atmosférica (0.1 MPa) e com vácuo de 30%;

\*\*Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl;

DP – Desvio padrão.

Tabela 39 - Quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl para alfa igual a 9, com 55% vácuo

Tempo de demolha (min)	H <sub>2</sub> O – 200 MPa						H <sub>2</sub> O – Controlo*					
	gH <sub>2</sub> O/gSI		Percentagem (%)		mf/mi		gH <sub>2</sub> O/gSI		Percentagem (%)		mf/mi	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP
0	1,5335	0,0080	54,8	0,3	1,3721	0,0072	1,1176	0,1545	43,3	6,0	1,0000	0,0000
0,08	1,7083	0,0325	56,2	1,1	1,5285	0,0290	1,6173	0,0025	58,1	0,1	1,4471	0,0023
1	1,5985	0,0094	56,4	0,3	1,4302	0,0084	1,6283	0,0323	57,1	1,1	1,4569	0,0289
2	1,5816	0,0030	55,9	0,1	1,4151	0,0027	1,5768	0,0123	56,7	0,4	1,4109	0,0110
3	1,5335	0,0080	54,8	0,3	1,3721	0,0072	1,5386	0,0730	55,5	2,6	1,3766	0,0653

Tempo de demolha (min)	NaCl						NaCl – Controlo*					
	gNaCl/gSI		Percentagem (%)		mf/mi		gNaCl/gSI		Percentagem (%)		mf/mi	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP
0	0,464	0,003	18,0	0,1	1,000		0,464	0,003	18,0	0,1	1,000	
0,08	0,364	0,000	13,0	0,0	0,785	0,001	0,3809	0,002	13,7	0,1	0,821	0,003
1	0,355	0,002	11,7	0,1	0,766	0,005	0,3827	0,003	13,4	0,1	0,825	0,006
2	0,356	0,004	12,5	0,1	0,766	0,008	0,3787	0,006	13,6	0,2	0,816	0,013
3	0,331	0,001	11,7	0,0	0,713	0,003	0,3975	0,000	14,3	0,0	0,857	0,001

\* Ensaios de controlo realizados a pressão atmosférica (0.1 MPa) e com vácuo de 55%;

\*\*Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl;

DP – Desvio padrão.

Tabela 40 - Quantidade de H<sub>2</sub>O e NaCl para alfa igual a 9, com 85% vácuo

Tempo de demolha (min)	H <sub>2</sub> O – 200 MPa						H <sub>2</sub> O – Controlo*					
	gH <sub>2</sub> O/gSI		Percentagem (%)		mf/mi		gH <sub>2</sub> O/gSI		Percentagem (%)		mf/mi	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP
0	1,1176	0,1545	43,3	6,0	1,0000		1,1176	0,1545	43,3	6,0	1,0000	
0,08	1,5475	0,0265	55,5	1,0	1,3846	0,0237	1,5666	0,0201	56,3	0,7	1,4018	0,0180
1	1,5750	0,0424	55,9	1,5	1,4092	0,0380	1,5668	0,0261	57,1	0,9	1,4019	0,0233
2	1,6619	0,0168	56,8	0,6	1,4870	0,0151	1,5784	0,0001	56,9	0,0	1,4122	0,0001
3	1,6740	0,0128	57,7	0,4	1,4978	0,0114	1,5005	0,0222	54,1	0,8	1,3426	0,0198

Tempo de demolha (min)	NaCl						NaCl – Controlo*					
	gNaCl/gSI		Percentagem (%)		mf/mi		gNaCl/gSI		Percentagem (%)		mf/mi	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP
0	0,464	0,003	18,0	0,1	1,000		0,464	0,003	18,0	0,1	1,000	
0,08	0,382	0,006	13,7	0,2	0,823	0,014	0,3864	0,008	13,9	0,3	0,833	0,017
1	0,378	0,001	13,4	0,0	0,815	0,003	0,3718	0,009	13,5	0,3	0,801	0,020
2	0,345	0,006	11,8	0,2	0,743	0,014	0,3803	0,001	13,7	0,0	0,820	0,003
3	0,374	0,004	12,9	0,1	0,807	0,008	0,3756	0,006	13,5	0,2	0,810	0,014

\* Ensaios de controlo realizados a pressão atmosférica (0.1 MPa) e com vácuo de 85%;

\*\*Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl;

DP – Desvio padrão.

### Anexo C3 - Ensaio de otimização da demolha do bacalhau

**Tabela 41** - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha: Ensaio 1a

Ensaio de demolha (55% vácuo/200Mpa)	H <sub>2</sub> O			NaCl		
	gH <sub>2</sub> O/gSI	Percentagem (%)	mf/mi	gNaCl/gSI	Percentagem (%)	mf/mi
<b>Valor inicial (bacalhau salgado seco)</b>	1,4919±0,0552	49.5±1.7	1.0000	0,524±0.037	17.4±1.1	1.000
<b>5 minutos</b>	1,8412±0,0109	55.7±0.3	1.2341±0.0073	0,400±0,001	13.3±0.0	0.763±0.002
<b>5 minutos + 5 minutos</b>	2,0033±0,0629	58.2±1.8	1.3428±0.0421	0,331±0,004	11.0±0.1	0.631±0.008
<b>10 minutos</b>	1,9085±0,0657	58.2±2.0	1.2793±0.0440	0,333±0,001	11.1±0.0	0.636±0.002

\*Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl.

**Tabela 42** - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha: Ensaio 1b

Ensaio de demolha (85% vácuo/200Mpa)	H <sub>2</sub> O			NaCl		
	gH <sub>2</sub> O/gSI	Percentagem (%)	mf/mi*	gNaCl/gSI	Percentagem (%)	mf/mi*
<b>Valor inicial (bacalhau salgado seco)</b>	1,4919±0,0552	49.5±1.7	1.0000	0,524±0.037	17.4±1.1	1.000
<b>5 minutos</b>	1,9215±0,0738	63.7±2.5	1.2880±0.0495	0,393±0,001	11.4±0.0	0.749±0.002
<b>5 minutos + 5 minutos</b>	2,1115±0,0895	70.0±3.0	1.4153±0.0600	0,345±0,013	9.5±0.1	0.658±0.024
<b>10 minutos</b>	1,8948±0,0430	62.8±1.4	1.2701±0.0288	0,386±0,007	11.3±0.2	0.736±0.014
<b>Controlo</b>						
<b>5 minutos + 5 minutos (85% vácuo/0.1Mpa)</b>	2,0499±0,0801	68.0±2.7	1.3740±0.0537	0,326±0,001	9.2±0.0	0.621±0.002

\*Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl.

Tabela 43 - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha: Ensaio 2a

Ensaio de demolha	H <sub>2</sub> O			NaCl		
	gH <sub>2</sub> O/gSI	Percentagem (%)	mf/mi	gNaCl/gSI	Percentagem (%)	mf/mi
<b>Valor inicial</b>						
<b>(bacalhau sagado seco)</b>	1,1176±0,1545	43,3±6,0	1,0000	0,464±0,003	18,0±0,1	1,000
<b>30 minutos</b>	1,7376±0,0455	60,3±1,6	1,5547±0,0407	0,288±0,003	10,0±0,1	0,621±0,007
<b>Minutos a 200 MPa</b>	<b>0,08</b>	1,8274±0,0523	62,0±1,8	1,6350±0,0468	0,255±0,019	0,551±0,042
	<b>1</b>	1,8612±0,0510	62,0±1,7	1,6653±0,0456	0,250±0,022	0,540±0,048
	<b>3</b>	1,8167±0,0314	60,9±1,1	1,6255±0,0281	0,253±0,003	0,545±0,006
	<b>5</b>	1,8912±0,0717	61,9±2,3	1,6921±0,0641	0,254±0,003	0,547±0,007
	<b>10</b>	1,8509±0,0197	61,8±0,7	1,6561±0,0177	0,248±0,001	0,535±0,003
	<b>0.08</b>	1,8582±0,0816	61,9±2,7	1,6626±0,0730	0,247±0,023	0,532±0,049
<b>Controlo: minutos a 0.1 MPa</b>	<b>1</b>	1,7734±0,1389	59,1±4,6	1,5868±0,1243	0,260±0,001	0,561±0,001
	<b>3</b>	1,8508±0,1269	61,6±4,2	1,6560±0,1136	0,271±0,001	0,584±0,002
	<b>5</b>	1,8890±0,1011	63,7±3,4	1,6902±0,0905	0,252±0,001	0,542±0,001
	<b>10</b>	1,7842±0,0989	60,0±3,3	1,5964±0,0885	0,249±0,002	0,537±0,004

\*Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl.

Tabela 44 - Ensaio sob alta pressão para otimização do processo de demolha: Ensaio 2b

Ensaio de demolha	H <sub>2</sub> O			NaCl		
	gH <sub>2</sub> O/gSI	Percentagem (%)	mf/mi	gNaCl/gSI	Percentagem (%)	mf/mi
<b>Valor inicial</b>	1,1176 ±0,1545	43,3±5,0	1,0000	0,464 ±0,003	18,0±0,1	1,000
<b>30 minutos</b>	1,7376 ±0,0455	60,3±1,6	1,5547 ±0,0407	0,288 ±0,003	10,0±0,1	0,621 ±0,007
<b>REPOUSO: 60 MINUTOS</b>						
<b>+ 5 segundos</b>	<b>85% vácuo</b>	1,8581	1,6625	0,223	7,5±0,1	0,480
	<b>200 MPa</b>	±0,0176	±0,0158	±0,004		±0,008
	<b>85% vácuo</b>	1,8925	1,6933	0,214	7,0±0,1	0,461
	<b>0.1 MPa</b>	±0,0429	±0,0384	±0,002		±0,004
<b>+ 1 minuto</b>	<b>85% vácuo</b>	2,1588	1,9316	0,204	6,3±0,2	0,439
	<b>200 MPa</b>	±0,0328	±0,0294	±0,006		±0,013
	<b>85% vácuo</b>	2,0287	1,8151	0,225	7,4±0,3	0,485
	<b>0.1 MPa</b>	±0,0242	±0,0216	±0,008		±0,017
	<b>Sem vácuo</b>	1,8183	1,6269	0,239	8,1±0,1	0,514
	<b>0.1 MPa</b>	±0,0321	±0,0287	±0,001		±0,003

\*Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl.

## Anexo D – Demolha de bacalhau a 4 e 20°C

### Anexo D1 – Estudo da demolha de bacalhau a 4º e 20°C

Tabela 45 – Valores obtidos para quantidade de NaCl e H<sub>2</sub>O

Tempo de demolha (min)	20°C					
	H <sub>2</sub> O			NaCl		
	gH <sub>2</sub> O/gSI	Percentagem (%)	Mf/mi	gNaCl/gSI	Percentagem (%)	Mf/mi
0	1,1524±0,0339	44,1±1,3	1,000±0,000	0,460±0,031	17,6±1,2	1,000±0,000
15	1,8825±0,0286	58,3±0,9	1,634±0,023	0,270±0,031	8,4±1,0	0,586±0,027
60	2,1855±0,1542	61,6±3,9	1,865±0,103	0,195±0,031	5,7±0,8	0,384±0,047
240	2,4700±0,1938	66,6±4,9	2,156±0,130	0,138±0,007	3,5±0,2	0,247±0,014
480	2,7410±0,0453	75,9±1,3	2,379±0,031	0,082±0,001	2,3±0,0	0,179±0,015
960	2,5829±0,1184	72,1±3,3	2,241±0,037	0,055±0,001	1,5±0,0	0,120±0,006

Tempo de demolha (min)	4°C					
	H <sub>2</sub> O			NaCl		
	gH <sub>2</sub> O/gSI	Percentagem (%)	Mf/mi	gNaCl/gSI	Percentagem (%)	Mf/mi
0	1,1524±0,0339	44,1±1,3	1,000±0,000	0,4600±0,0315	17,6±1,2	1,000±0,000
15	1,6464±0,0501	56,3±1,7	1,429±0,001	0,3259±0,0090	11,1±0,3	0,709±0,029
60	1,8874±0,0397	59,0±1,2	1,639±0,083	0,2133±0,0004	6,0±0,0	0,465±0,031
240	2,3329±0,0662	69,3±2,0	2,024±0,002	0,1528±0,0041	4,5±0,1	0,333±0,014
480	2,4482±0,0662	70,3±2,0	2,124±0,002	0,1071±0,0041	3,5±0,1	0,233±0,014
960	2,6009±0,1020	75,8±3,0	2,257±0,022	0,0861±0,0050	2,5±0,2	0,188±0,024

\*Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl.

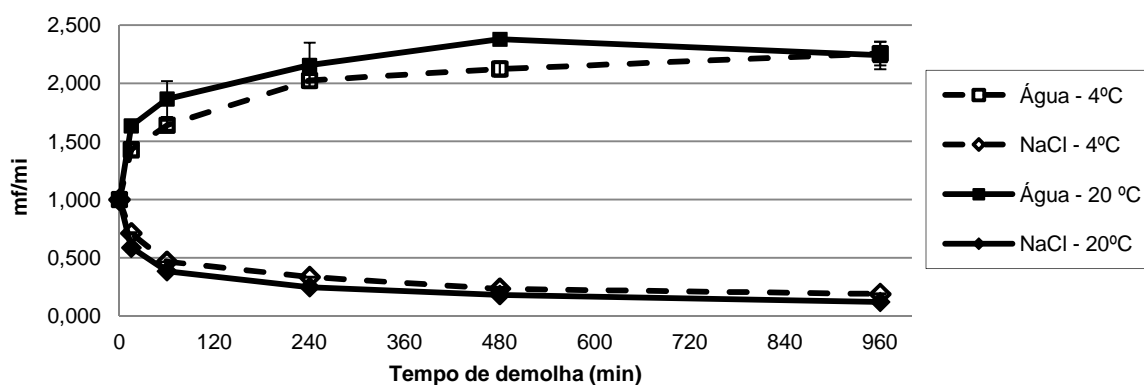


Figura 35 - Variação da quantidade no músculo do bacalhau durante o processo de demolha a 4º e 20°C. Mf/mi: relação massa final e massa inicial de H<sub>2</sub>O e NaCl



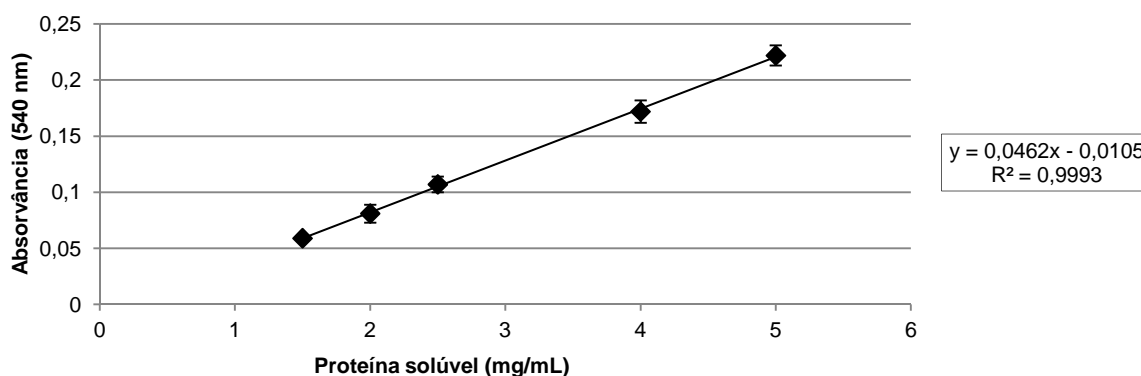
## Anexo D2 – Estudo da proteína solúvel no processo de demolha

### Curva de calibração

**Tabela 46** - Valores obtidos para a curva de calibração na quantificação da proteína solúvel pelo método de Biureto

	Concentração (mg/mL)	Abs 540nm (1)	Abs 540nm (2)	Média	Desv. Pad.
Sol. Padrão 1	0,0015	0,058	0,059	0,059	0,001
Sol. Padrão 2	0,002	0,075	0,086	0,081	0,008
Sol. Padrão 3	0,0025	0,112	0,102	0,107	0,007
Sol. Padrão 4	0,004	0,179	0,165	0,172	0,01
Sol. Padrão 5	0,005	0,228	0,215	0,222	0,009

Nota: Absorvância do branco = 0.120.



**Figura 36** – Curva de calibração para a determinação da proteína solúvel

**Tabela 47** – Valores obtidos para a quantidade de proteína solúvel no músculo de bacalhau ao longo do processo de demolha a 4 e 20°C

Tempo (min)	20°C		4°C	
	Média	Desv. Pad.	Média	Desv. Pad.
0*	138,84	10,44	138,8	10,4
15	117,50	1,45	104,1	4,5
60	96,19	0,45	78,3	0,8
240	71,29	0,48	70,3	8,5
480	57,18	1,00	54,2	0,5
960	58,70	0,49	49,2	3,2

\*Bacalhau salgado seco.

**Anexo D3 - Variações de massa de proteína solúvel verificadas no bacalhau e na água de demolha**Variações de massa de proteína no bacalhau:

$$C_i = 138,84 \text{ mg/g SI}$$

$$m_{SI} = 1,5462 \text{ g}$$

$$m_{\text{prot.i}} = C_i \cdot m_{SI} = 214,67 \text{ mg}$$

$$C_f = 58,70 \text{ mg/g SI}$$

$$m_{SI} = 1,5833 \text{ g}$$

$$m_{\text{prot.f}} = C_f \cdot m_{SI} = 92,94 \text{ mg}$$

$$\Delta \text{ Proteína (no bacalhau)} = 214,67 - 92,94 = 121,73 \text{ mg.}$$

Variações de massa de proteína na água de demolha:

$$C_i \approx 0$$

$$m_f \approx 0$$

$$C_f = 3,391 \text{ mg/mL}$$

$$V = 30,0 \text{ mL}$$

$$m_f = 101,73 \text{ mg}$$

$$\Delta \text{ Proteína (na água de demolha)} = 101,73 \text{ mg.}$$

## Anexo E – Estudo da atividade enzimática no processo de demolha de bacalhau

### Anexo E1 – Fosfatase ácida

**Tabela 48** – Valores obtidos para a atividade da fosfatase ácida durante o processo de demolha de bacalhau

Tempo de demolha (min)	Atividade da fosfatase ácida (U/g bacalhau salgado ou aumento de absorvância (400 nm)/minuto/g de bacalhau salgado)	
0*	0,9483±0,0419	
	4°C	20°C
15	0,9590±0,0221	0,4831±0,0043
60	0,8033±0,0140	0,4601±0,0087
240	0,5062±0,0515	0,2953±0,0444
480	0,4908±0,0317	0,1409±0,0047
960	0,6600±0,0504	0,2549±0,0104

\*Bacalhau salgado seco.

### Anexo E2 – Catepsina B

**Tabela 49** - Valores obtidos para a atividade da catepsina B durante o processo de demolha de bacalhau

Tempo de demolha (min)	Atividade da catepsina B (U/g bacalhau salgado ou aumento de fluorescência (ex:360 nm/em:460 nm)/minuto/g bacalhau salgado)	
0*	1210±153	
	4°C	20°C
15	1192±48	849±243
60	894±57	560±22
240	390±6	343±98
480	499±88	452±67
960	357±6	267±38

\*Bacalhau salgado seco.

### Anexo E3 – Catepsina D

**Tabela 50** – Valores obtidos para a curva de calibração da tirosina

[Tyr] (mg/mL)	Absorvância (280 nm)			Absorvância (280 nm) - Branco			Média	Desvio Padrão
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
250,0	0,828	0,830	0,829	0,726	0,728	0,727	0,727	0,001
125,0	0,544	0,541	0,542	0,442	0,439	0,440	0,441	0,002
62,5	0,411	0,401	0,401	0,309	0,299	0,299	0,303	0,006
31,3	0,235	0,234	0,233	0,133	0,132	0,131	0,132	0,001
15,6	0,175	0,172	0,175	0,073	0,070	0,073	0,072	0,002

Nota: Absorvância (branco) = 0.102±0.005.

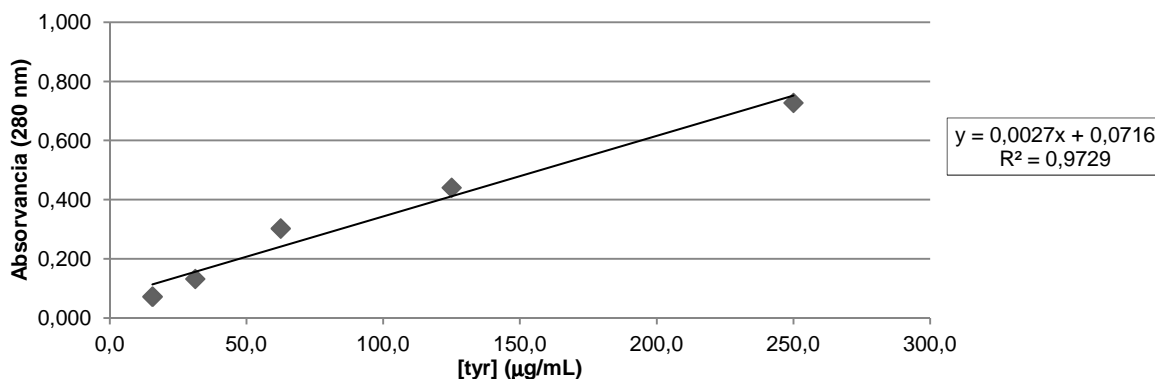


Figura 37 – Curva de calibração da tirosina

Tabela 51 - Valores obtidos para a atividade da catepsina D durante o processo de demolha de bacalhau

Tempo de demolha (min)	Atividade da catepsina D (U/g bacalhau salgado ou µmol tirosina/minuto/g de bacalhau salgado)	
0*	8,6884±0,2211	
	4°C	20°C
15	8,5636±0,4189	6,7202±0,4603
60	7,4416±0,0918	6,1311±0,4415
240	7,3053±0,3490	5,9553±0,4724
480	3,1973±0,3364	2,9210±0,0774
960	4,5613±0,1903	3,3733±0,0787

\*Bacalhau salgado seco.

## Anexo E4 – Lipase

Tabela 52 - Valores obtidos para a atividade da lipase durante o processo de demolha de bacalhau

Tempo de demolha (min)	Atividade da lipase (U/g bacalhau salgado ou equivalentes de ácidos gordos/minuto/g de bacalhau salgado)	
0*	3,78±0,94	
	4°C	20°C
15	1,81±0,90	4,13±0,17
60	1,05±0,91	4,41±0,90
240	2,05±0,89	15,01±1,58
480	2,85±0,90	16,27±0,92
960	12,08±0,91	13,97±0,88

\*Bacalhau salgado seco.